

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacología



## TESIS DOCTORAL

**Actividad neuroprotectora del aceite esencial de *Salvia lavandulifolia*  
Vahl**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**María Porres Martínez**

Directoras

María Pilar Gómez-Serranillos Cuadrado  
María Emilia Carretero Accame

**Madrid, 2014**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Farmacología**



**TESIS DOCTORAL**

**Actividad neuroprotectora del  
aceite esencial de  
*Salvia lavandulifolia* Vahl.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**María Porres Martínez**

DIRECTORAS

**María Pilar Gómez-Serranillos Cuadrado  
María Emilia Carretero Accame**

Madrid, 2013



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacología



**Actividad neuroprotectora del  
aceite esencial de  
*Salvia lavandulifolia* Vahl.**

**TESIS DOCTORAL**

**María Porres Martínez**

Madrid, 2013





# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacología

Dra. Dña. **M<sup>a</sup> Pilar Gómez-Serranillos Cuadrado**, Profesora Titular, y Dra. Dña. **M<sup>a</sup> Emilia Carretero Accame**, Profesora Emérita Complutense, del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral presentada por Dña. **María Porres Martínez**, titulada "Actividad neuroprotectora del aceite esencial de *Salvia lavandulifolia* Vahl.", ha sido realizada bajo nuestra inmediata dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos su presentación para que sea juzgada por el Tribunal correspondiente.

Madrid, Julio 2013

Dra. M<sup>a</sup> Pilar Gómez-Serranillos

Dra. M<sup>a</sup> Emilia Carretero Accame



# **AGRADECIMIENTOS**

*Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido a que esta Tesis Doctoral se haya podido llevar a cabo.*

*En primer lugar a mis directoras de tesis por su dirección y asesoramiento durante estos años, la Dra. M<sup>a</sup> Pilar Gómez-Serranillos por su valiosa ayuda y la Dra. M<sup>a</sup> Emilia Carretero Accame, por su apoyo incondicional diario y su cariño. Gracias por haberme brindado la oportunidad de trabajar en el Grupo de Investigación "Farmacología de Productos Naturales".*

*A todo el departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la UCM y a su Directora la Dra. Paulina Bermejo. Así como a la Dra. Paloma Bermejo y la Dra. Sagrario Martín por su ayuda con las células. Y en especial a la Dra. Teresa Ortega por su alegría y sus constantes ánimos.*

*Gracias a la Dra. Angelines Cases, del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) por la asistencia técnica con el análisis de Cromatografía de Gases.*

*A Elena, gracias por tu vitalidad, tu sencillez y gran calidad humana con la que me dejaste ser tu sombra al principio y me guiaste en este mundo. Y por supuesto gracias a Ana y Tarek II por vuestro ánimo y cariño. Así como al resto de compañeros del laboratorio, algunos que ya se fueron y dejaron huella como Adil, Judith, Sandra y Pasquale; y otros que siguen aquí dándolo todo y regalando una sonrisa: Pilar, Manal, Tarek I, Carlos, Nagla, Laura, Adriana, Jorge, Alba, Vanesa, Karim, Miguel, Andrea... Gracias a Rosa por tus ánimos llenos de cariño, a Jesús y Azucena.*

*A Irene, gracias por tu ayuda, tus consejos y tus ánimos en los momentos de dudas. Por encontrar en ti una sonrisa alegre siempre que la he necesitado. A Janire por los comienzos, por hacerme sentir más cerca de casa y por ser como eres. A Natalia C, por*



*tus ánimos, optimismo y por los momentos vividos. A Roberto, gracias por escucharme día a día, animarme en los momentos de desánimo y las veladas compartidas.*

*A Mercedes, por todas las facilidades que me has dado en el final de esta tesis.*

*A Natalia G, gracias por comprenderme, escucharme, devolverme la confianza en mí misma cuando la pierdo y por tus constantes ánimos. Gracias porque aparte de ser un gran ejemplo eres una gran amiga.*

*A Raúl, gracias por transmitirme tus inquietudes por la vida y por la ciencia, gracias por apoyarme, aguantar mis altibajos y darme tu cariño siempre.*

*Gracias a mis amigos de toda la vida, por ser mis amigos, por seguir ahí y poder contar con vosotros a pesar de que no os haya podido dedicar mucho tiempo en estos últimos años. Especialmente a Rakel, Nuria, Andrea, Igone, Iratxe, Jose, Patricia y Enrique por escucharme a pesar de todo. Y gracias a Jota por tu optimismo y alegría.*

*Gracias a los más importantes, a mi familia. A mis abuelos. A Gorka por mantenerme cerca de mi sobrino y hacerme sentir como en casa con las nuevas tecnologías. Especialmente gracias a mi hermana Laura, por estar siempre a mi lado, por tus palabras, tus ánimos, por creer que soy una persona capaz y que puedo conseguirlo. Gracias a mi sobrino Aimar, por ser la alegría de mi vida y por conseguir sacarme una sonrisa incluso en los peores momentos. Gracias a la segunda alegría de mi vida que está en camino. Y mil gracias a mis padres, por ser mis ángeles de la guarda, por confiar en mí, por darme siempre vuestro ánimo, por vuestra paciencia y por vuestros sabios consejos, de todo se aprende y no hay que dejar las cosas a medias. Nunca podré agradeceros todo lo que me habéis dado sin esperar nada a cambio. Sin vosotros esta tesis no hubiera sido posible. Perdonar por todos los momentos que nos ha robado. Y gracias de todo corazón por quererme y apoyarme incondicionalmente en todo lo que hago.*

*Muchas gracias a todos.*



*"Los años enseñan muchas cosas que los días desconocen."*

*Ralph Waldo Emerson*



# ABREVIATURAS

<b>AAPH</b>	2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro
<b>Ac-DEVD-AMC</b>	[N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-AMP (7-amino-4-metilcumarina)]
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ANOVA</b>	Análisis de la varianza
<b>ARE</b>	Elemento de respuesta antioxidante
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>AUC</b>	Área bajo la curva
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>CG</b>	Cromatografía de gases
<b>CO</b>	Monóxido de carbono
<b>DCF</b>	Diclorofluoresceína
<b>DCFH-DA</b>	Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DTPA</b>	Ácido dietilentriaminopentaacético
<b>ECL</b>	Electroquimioluminiscencia
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EGTA</b>	Ácido bis (2-aminoetil) etilenoglicol- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacético
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino
<b>G6PDH</b>	Glucosa 6-fosfato-deshidrogenasa
<b>GPx</b>	Glutación peroxidasa
<b>GR</b>	Glutación reductasa
<b>GSH</b>	Glutación reducido
<b>GSSG</b>	Glutación oxidado
<b>HEPES</b>	Ácido <i>N</i> -(2-hidroxietil) piperacina- <i>N'</i> -2'-etanosulfónico
<b>HO-1</b>	Hemooxigenasa-1
<b>HS</b>	Suero de caballo
<b>IR</b>	Índice redox

<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>MDA</b>	Malondialdehído
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-ilo]-2,5-difeniltetrazol
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido
<b>NADPH</b>	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido
<b>NEM</b>	<i>N</i> -etilmaleimida
<b>Nrf2</b>	Factor nuclear eritroide-2
<b>OPT</b>	Fluoróforo <i>o</i> -ptaldehído
<b>ORAC</b>	Capacidad de absorción del radical oxígeno
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetanosulfonio
<b>PVDF</b>	Polivinilpirrolidona
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>Rt</b>	Tiempo de retención
<b>SD</b>	Desviación estándar
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecil sulfato sódico
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>TBARS</b>	Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico
<b>TEMED</b>	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletilenodiamina
<b>TRIS</b>	Tris (hidroximetil) aminometano
<b>UI</b>	Unidades internacionales

# ÍNDICE



<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1. JUSTIFICACIÓN	3
2. OBJETIVOS	8
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>11</b>
1. SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	13
1.1. <b>Células nerviosas</b>	13
1.1.1. Neuronas	13
1.1.2. Células gliales	14
1.1.3. Efecto neuroprotector de los astrocitos	16
1.2. <b>Estrés oxidativo</b>	18
1.2.1. Especies reactivas de oxígeno (ROS)	19
1.2.1.1. Tipos de ROS	22
• Radical superóxido	23
• Peróxido de hidrógeno	23
• Radical hidroxilo	24
• Oxígeno singlete	24
• Radical peroxilo	25
• Óxido nítrico	25
• Dióxido de nitrógeno	25
• Anión peroxinitrito	25
1.2.1.2. Daño oxidativo a las biomoléculas	26
• Daño oxidativo a ácidos nucleicos	26
• Daño oxidativo a lípidos	27
• Daño oxidativo a proteínas	28
• Daño oxidativo a hidratos de carbono	29
1.2.2. Sistemas protectores frente al daño oxidativo	29
1.2.2.1. Sistemas antioxidantes enzimáticos	30
• Enzima catalasa (CAT)	31
• Enzima superóxido dismutasa (SOD)	32
• Enzima glutatión peroxidasa (GPx)	32
• Enzima glutatión reductasa (GR)	33
• Enzima hemo-oxigenasa (HO)	34
1.2.2.2. Sistemas antioxidantes no enzimáticos	36
• Sistema glutatión	37
• Ácido úrico	38
• Bilirrubina	39
• Coenzima Q	39
• Vitamina A (retinol)	39
• Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol)	39
• Vitamina C (ácido ascórbico)	40



• Carotenos	40
1.2.2.3. Nrf2-ARE	40
1.3. <b>Enfermedades neurodegenerativas asociadas al estrés oxidativo</b>	42
1.3.1. Enfermedades neurodegenerativas	43
1.3.1.1. Enfermedad de Alzheimer	44
1.3.1.2. Enfermedad de Parkinson	44
1.3.1.3. Esclerosis lateral amiotrófica	45
1.3.1.4. Enfermedad de Huntington	45
2. <b>SALVIA LAVANDULIFOLIA VAHL.</b>	47
2.1. <b>Género <i>Salvia</i> L.</b>	47
2.2. <b>Clasificación taxonómica de <i>Salvia lavandulifolia</i> Vahl.</b>	49
2.3. <b>Descripción botánica</b>	51
2.4. <b>Distribución geográfica</b>	55
2.5. <b>Hábitat</b>	56
2.6. <b>Composición química</b>	56
• Aceite esencial	57
2.7. <b>Etnofarmacología</b>	61
2.8. <b>Actividad farmacológica</b>	62
• Aceite esencial	64
- Inhibición del enzima acetilcolinesterasa	64
- Antioxidante	67
- Antiinflamatorio	68
- Estrogénico	68
- Otras actividades	69
2.9. <b>Toxicidad y efectos adversos</b>	71
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>77</b>
1. <b>MATERIAL</b>	79
1.1. <b>Material vegetal</b>	79
1.1.1. <i>Salvia lavandulifolia</i> Vahl.	79
• Aceite esencial	81
• Monoterpenos	81
1.2. <b>Líneas celulares</b>	82
1.2.1. PC12	82
1.2.2. U373-MG	83
1.3. <b>Inductor de estrés oxidativo: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	83

1.4. <b>Material de laboratorio</b>	84
2. <b>MÉTODOS</b>	87
2.1. <b>Estudio fitoquímico</b>	87
2.1.1. Extracción del aceite esencial por hidrodestilación	87
2.1.2. Determinación de la composición química por CG	88
2.2. <b>Estudio de la actividad farmacológica</b>	89
2.2.1. Determinación de la actividad antioxidante: Ensayo ORAC	89
2.2.2. Cultivos celulares	91
2.2.2.1. Mantenimiento de las líneas celulares	91
2.2.2.2. Subcultivo celular	92
2.2.2.3. Congelación celular	93
2.2.2.4. Descongelación celular	93
2.2.2.5. Tratamiento celular	94
2.2.3. Estudio de citotoxicidad celular: ensayo de MTT	94
2.2.4. Estudio de la morfología celular	97
2.2.5. Determinación de la generación de ROS: ensayo de la diclorofluoresceína (DCFH-DA)	97
2.2.6. Preparación de extractos celulares.	99
2.2.7. Determinación de la concentración de proteínas: método del ácido bicínico	102
2.2.8. Determinación de los niveles de glutatión: GSH y GSSG	103
2.2.9. Determinación de la actividad enzimática antioxidante	106
2.2.9.1. Actividad catalasa (CAT)	106
2.2.9.2. Actividad superóxido dismutasa (SOD)	108
2.2.9.3. Actividad glutatión peroxidasas (GPx)	110
2.2.9.4. Actividad glutatión reductasa (GR)	113
2.2.9.5. Actividad hemo-oxigenasa (HO-1)	115
2.2.10. Determinación de la expresión de proteínas: técnica de Western Blot (WB)	117
2.2.11. Determinación de peroxidación lipídica: ensayo de TBARS	122
2.2.12. Determinación de la actividad de caspasa-3	123
2.3. <b>Análisis estadístico</b>	124

<b>RESULTADOS</b>	<b>125</b>
<b>1. ESTUDIO DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>SALVIA LAVANDULIFOLIA</i></b>	<b>127</b>
<b>1.1. Estudio fitoquímico</b>	<b>127</b>
1.1.1. Rendimiento del aceite esencial	127
1.1.2. Composición química	128
<b>1.2. Estudio de la actividad farmacológica</b>	<b>134</b>
1.2.1. Capacidad antioxidante	134
1.2.2. Actividad neuroprotectora sobre línea celular PC12 en un modelo de estrés oxidativo inducido por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	136
1.2.2.1. Citotoxicidad celular	136
1.2.2.2. Efecto protector frente a la toxicidad inducida por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	138
1.2.2.3. Efecto sobre la morfología celular	139
1.2.2.4. Efecto sobre la producción de ROS	141
1.2.2.5. Efecto sobre los niveles de GSH y GSSG	143
1.2.2.6. Efecto sobre el sistema antioxidante enzimático	145
1.2.2.7. Efecto sobre la vía Nrf2	152
1.2.2.8. Efecto sobre la peroxidación lipídica	154
1.2.2.9. Efecto sobre la actividad de la caspasa-3	155
1.2.3. Actividad citoprotectora sobre la línea celular U373-MG en un modelo de estrés oxidativo inducido por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	156
1.2.3.1. Citotoxicidad celular	156
1.2.3.2. Efecto protector frente a la toxicidad inducida por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	157
1.2.3.3. Efecto sobre la morfología celular	158
1.2.3.4. Efecto sobre la producción de ROS	160
1.2.3.5. Efecto sobre los niveles de GSH y GSSG	162
1.2.3.6. Efecto sobre el sistema antioxidante enzimático	164
1.2.3.7. Efecto sobre la vía Nrf2	172
1.2.3.8. Efecto sobre la peroxidación lipídica	173
1.2.3.9. Efecto sobre la actividad de la caspasa-3	174
<b>2. ESTUDIO DE LOS MONOTERPENOS AISLADOS: <math>\alpha</math>-PINENO, 1,8-CINEOL Y ALCANFOR</b>	<b>176</b>
<b>2.1. Estudio de la actividad farmacológica</b>	<b>176</b>
2.1.1. Capacidad antioxidante	176
2.1.2. Actividad neuroprotectora sobre línea celular PC12 en un modelo de estrés oxidativo inducido por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	177
2.1.2.1. Citotoxicidad celular	177
2.1.2.2. Efecto protector frente a la toxicidad inducida por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	178

2.1.2.3. Efecto sobre la morfología celular	179
2.1.2.4. Efecto sobre la producción de ROS	181
2.1.2.5. Efecto sobre el sistema antioxidante enzimático	183
2.1.2.6. Efecto sobre la vía Nrf2	185
2.1.2.7. Efecto sobre la peroxidación lipídica	187
2.1.2.8. Efecto sobre la actividad de la caspasa-3	188
2.1.3. Actividad citoprotectora sobre la línea celular U373-MG en un modelo de estrés oxidativo inducido por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	189
2.1.3.1. Citotoxicidad celular	189
2.1.3.2. Efecto protector frente a la toxicidad inducida por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	190
2.1.3.3. Efecto sobre la morfología celular	191
2.1.3.4. Efecto sobre la producción de ROS	193
2.1.3.5. Efecto sobre el sistema antioxidante enzimático	194
2.1.3.6. Efecto sobre la vía Nrf2	197
2.1.3.7. Efecto sobre la peroxidación lipídica	198
2.1.3.8. Efecto sobre la actividad de la caspasa-3	199
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>201</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>223</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>227</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>245</b>



# **INTRODUCCIÓN**



# 1. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, con el incremento de la esperanza de vida, se registra un aumento progresivo del envejecimiento de la población y por tanto, una mayor prevalencia de las enfermedades asociadas con la edad, entre las que destacan, las enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica o la enfermedad de Huntington (*De-Paula et al., 2012; Mhyre et al., 2012; Morrison et al., 2012; Ruiz et al 2012; Venkova-Hristova et al., 2012*). Esto representa un serio problema de salud pública, al deteriorarse progresivamente las funciones motoras y cognitivas de las personas afectadas, requiriendo atención especializada (*World Health Organization, 2009*).

La patogénesis de estas enfermedades está directamente relacionada con el estrés oxidativo, que produce alteración funcional de las neuronas y las células de la glía, su progresiva pérdida y finalmente, la muerte celular (*Pereira et al., 2012; Yan et al., 2012*). Por tanto, el estrés oxidativo se considera una diana terapéutica eficaz para el tratamiento de estos desórdenes neurodegenerativos (*Jenner, 2007; Valko et al., 2007*).

Varios son los factores que contribuyen al desarrollo del estrés oxidativo, entre ellos el propio envejecimiento, la disminución de la respuesta inmune o el aumento de la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS) (*Gandhi & Abramov, 2012*). Este último factor se produce por un desequilibrio redox intracelular debido a una formación excesiva de ROS (como por ejemplo, radical hidroxilo, anión superóxido o peróxido de hidrógeno), unido a un déficit en los mecanismos de defensa antioxidante endógenos (enzimas catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa o glutatión reductasa) que contrarrestan la acción degenerativa (*Ghosh et al., 2011*).

El daño oxidativo origina efectos perjudiciales en el organismo a distintos niveles (*Yan et al., 2012*), que pueden llegar a ser irreversibles (*Gilgun-Sherki et al., 2001*). En las



proteínas se produce la pérdida de su funcionalidad; en los lípidos, mediante la peroxidación lipídica, se pierde la integridad de las membranas celulares; los ácidos nucleicos se modifican afectando a la función metabólica celular, así mismo se observa una afectación a las enzimas antioxidantes que puede desencadenar incluso en la muerte celular (Halliwell, 1992; Grimm et al., 2011).

Las células del cerebro presentan diferente capacidad de resistencia frente al estrés oxidativo, siendo las células gliales más resistentes que las propias neuronas (unidad morfológica y funcional del sistema nervioso). Esto es debido a que los astrocitos (células gliales más abundantes del cerebro) presentan la capacidad de generar glutatión desde el metabolismo de la glucosa y de secretar moléculas de señalización celular. En las neuronas existe una mayor generación de ROS; ya que consumen mucho oxígeno en su metabolismo y su membrana, formada por ácidos grasos poliinsaturados, es muy susceptible a la oxidación; además, presenta bajos niveles de glutatión (el antioxidante endógeno más importante) y metales redox que intervienen en numerosas reacciones.

Se ha comprobado que los astrocitos proporcionan soporte físico, nutricional y metabólico, así como protección a las neuronas (Desagher et al., 1996; Maragakis & Rothstein, 2006). Protegen a las mismas frente al estrés oxidativo producido por ROS, al liberar antioxidantes, evitando la pérdida de la funcionalidad neuronal y mejorando las funciones cerebrales en general. La interacción entre las neuronas y los astrocitos es esencial para la supervivencia de las primeras y su normal funcionamiento (Barreto et al., 2011). Constituyendo de este modo los astrocitos una diana farmacológica de gran interés, debido a la protección que ejercen en el sistema nervioso central (SNC) y especialmente en las neuronas (Röhl et al., 2008).

En la actualidad queda mucho por avanzar en el conocimiento y, por tanto, el desarrollo de estas enfermedades neurodegenerativas. El enfoque terapéutico actual se dirige predominantemente a los principios activos que tratan la sintomatología de la

enfermedad o el retraso de su aparición. Es por ello que la búsqueda de nuevos principios activos que presenten potencial efecto terapéutico para prevenir y mejorar tanto los síntomas como la aparición de estas enfermedades crónicas, sigue siendo un importante reto en la investigación farmacológica.

Dentro de las posibles alternativas, los compuestos antioxidantes exógenos poseen capacidad de eliminar el exceso de ROS o evitar la generación de las mismas. Esto hace que las células sean más resistentes al ataque oxidativo, ejerciendo un efecto protector mediante la modulación del sistema antioxidante endógeno (*Dumont & Beal, 2011; Choi et al., 2012; Sheikh et al., 2012*).

En este sentido, en los últimos años el campo de investigación sobre plantas medicinales y compuestos obtenidos a partir de ellas constituye una fuente potencial importante, variada y prometedora de principios activos con propiedades terapéuticas interesantes. Pueden presentar capacidad antioxidante y protectora celular, siendo eficaces en el desarrollo de nuevas terapias farmacológicas para tratar enfermedades y más concretamente enfermedades del SNC asociadas a estrés oxidativo como las que se han comentado anteriormente mediante diferentes mecanismos de acción (*Niki, 2010; Campos et al., 2011; De-Paula et al., 2012; Jaydeokar et al., 2012; Koppula et al., 2012; Mhyre et al., 2012; Morrison et al., 2012; Ruiz et al 2012; Venkova-Hristova et al., 2012*).

El interés por los procesos degenerativos del envejecimiento llevó desde hace varios años al grupo de investigación "Farmacología de productos naturales" (Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia -UCM-) al estudio de la actividad farmacológica y el mecanismo de acción de plantas medicinales y de principios activos aislados de las mismas. Concretamente, los estudios se centran en actividad antioxidante, neuroprotectora, antiinflamatoria y anticancerígena; para ello se utilizan modelos experimentales, tanto *in vitro* como *in vivo*, encaminados a determinar el efecto de estos compuestos a nivel celular y molecular. Trabajos previos realizados

por nuestro grupo de investigación han demostrado interesantes resultados en la actividad antioxidante con *Panax ginseng* (Naval et al., 2006; Naval et al., 2007) o *Phaseolus vulgaris* (López et al., 2013); así como diversos polifenoles presentes en los extractos de uva y vino (Gómez-Serranillos et al., 2009; Martín et al., 2011; Martín et al., 2013) o diterpenos del género *Sideritis* (González-Burgos et al., 2012; González-Burgos et al., 2013).

Dentro de este campo, estudios científicamente probados, demuestran que las plantas aromáticas o ricas en aceite esencial, utilizadas desde la antigüedad no sólo como medicinales sino además por sus propiedades aromatizantes, presentan propiedades beneficiosas para la salud sobre diferentes órganos y sistemas (Edris, 2007; Wei & Shibamoto, 2007; Miguel, 2010; M'Hir et al., 2012; Srinivasan, 2013). Destaca la familia Lamiaceae, ya que los aceites esenciales que contienen sus diversas especies presentan diferentes compuestos orgánicos con actividad farmacológica (Beretta et al., 2011; Raja, 2012).

En concreto, especies aromáticas del género *Salvia* L. (Lamiaceae), en el que se incluye la especie objeto de estudio, *Salvia lavandulifolia* Vahl, presentan una elevada concentración de aceite esencial y han sido utilizadas tradicionalmente por sus propiedades terapéuticas (Sáez, 2010; Da Rocha et al., 2011). Entre ellas, la función protectora cerebral y sus efectos beneficiosos sobre la cognición, sirviendo como tratamiento preventivo y sintomático frente la disminución de la memoria relacionada con la edad (Perry et al., 1998; Lima et al., 2004).

La elección de esta especie no ha sido aleatoria, sino que se ha hecho en base a su amplio uso en medicina popular, al gran interés suscitado en los últimos años por la misma y por su carácter endémico en la Península Ibérica. Recientes estudios han demostrado la existencia de actividades antimicrobianas, citotóxicas, analgésicas y antiinflamatorias tanto en experimentación animal como clínica de esta especie. Así mismo, numerosos estudios han demostrado la capacidad del aceite esencial de *S.*

*lavandulifolia* como inhibidor de la acetilcolinesterasa lo que resulta de gran importancia en ciertas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Perry *et al.*, 2003; Savelev *et al.*, 2004; Tildesley *et al.*, 2005; Scholey *et al.*, 2008; Kennedy *et al.*, 2010).

La composición química cuantitativa y cualitativa de las plantas depende de factores agronómicos como estado fenológico de la planta, densidad de plantación del cultivo, exposición solar o frecuencia de riego. Estas variaciones producen cambios en la composición de su aceite esencial durante el ciclo vegetativo y en consecuencia afectan al rendimiento y a sus actividades biológicas. Existen estudios sobre la influencia del estado fenológico en la composición química y en la actividad antioxidante de los aceites esenciales en otras especies (Badi *et al.*, 2004; Jordán *et al.*, 2013).

Sin embargo, a pesar de las investigaciones disponibles sobre la composición química y la actividad del aceite esencial de *S. lavandulifolia*, poco se conoce sobre el papel del aceite esencial y sus principales monoterpenos como agentes potenciales protectores frente al daño oxidativo a nivel del SNC. Por ello, el estudio de muestras de plantas recolectadas en diferente estado fenológico y de plantas obtenidas de cultivos con diferente densidad de plantación, observando la influencia sobre la composición química de su aceite esencial y sobre su actividad protectora, presenta un gran interés farmacológico.

Todo lo anteriormente expuesto nos hace plantear el estudio en profundidad, en la presente Tesis Doctoral, de los beneficios antioxidantes de diferentes muestras del aceite esencial de *S. lavandulifolia* contra la degeneración celular inducida por especies reactivas al oxígeno y la posible aplicación en la prevención de procesos neurodegenerativos.

## 2. OBJETIVOS

En vista de la importancia de la investigación en la terapia frente a las enfermedades neurodegenerativas inducidas por el estrés oxidativo y la potencial actividad antioxidante del aceite esencial de *Salvia lavandulifolia* y sus principales monoterpenos, se plantea el estudio de su actividad como reguladores del equilibrio redox.

El **objetivo principal** de este trabajo de Tesis Doctoral es evaluar el posible efecto protector del aceite esencial de *S. lavandulifolia* y de sus componentes mayoritarios, sobre células PC12 (modelo neuronal) y células U373-MG (modelo de astrocitoma) bajo un modelo de estrés oxidativo, inducido por peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) *in vitro*.

Para ello, en la primera parte del trabajo se abordará el estudio de la composición química del aceite esencial de *S. lavandulifolia* procedente de diferentes cultivos del norte y centro de España. En una primera etapa se estudiará el aceite esencial proveniente de muestras recolectadas, en Aranjuez (Madrid), en diferente estado fenológico (antes de la floración y en plena floración); a continuación se estudiará el aceite esencial obtenido de muestras recolectadas, en Solsona (Lérida), en un cultivo experimental con diferente densidad de plantación (menor y mayor distancia entre líneas). Por último, se abordará el estudio de la actividad protectora basada en su actividad antioxidante de las muestras anteriormente mencionadas.

En la segunda parte del trabajo, se llevará a cabo el estudio de la actividad protectora de los monoterpenos mayoritarios determinados en los estudios de composición química del aceite esencial de *S. lavandulifolia*, en base a su actividad antioxidante a nivel celular.

Con este fin, se plantean los siguientes **objetivos específicos**:

- 1) Extraer por hidrodestilación y caracterizar químicamente el aceite esencial proveniente de muestras obtenidas de diferentes cultivos de *S. lavandulifolia* mediante cromatografía de gases.
- 2) Evaluar su capacidad antioxidante mediante el análisis de la capacidad de absorción de radicales.
- 3) Estudiar el efecto protector del aceite esencial y sus principales monoterpenos sobre el daño celular inducido por  $H_2O_2$  en los siguientes parámetros:
  - Efectos sobre la viabilidad y morfología celular.
  - Efectos sobre los marcadores del daño oxidativo: niveles intracelulares de ROS, niveles de GSH/GSSG, productos de la peroxidación lipídica y sistema de defensa antioxidante enzimático y no enzimático.
  - Intentar determinar el posible mecanismo de acción y si la vía Nrf2 está implicada.



# **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**





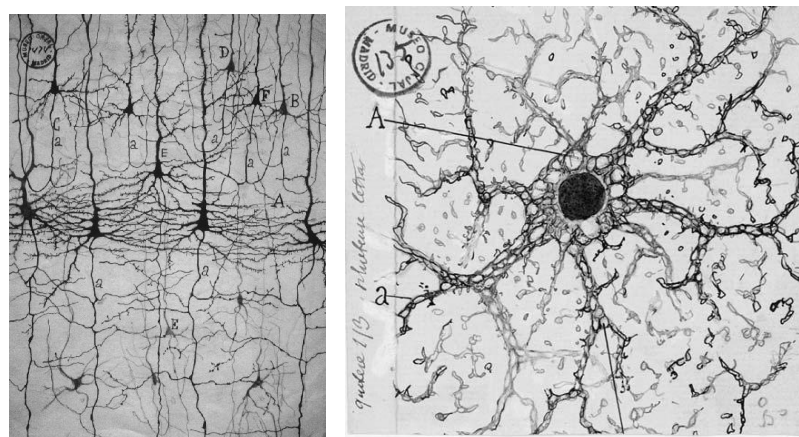
# 1. SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

## 1.1. CÉLULAS NERVIOSAS

De una forma general podemos decir que el sistema nervioso central (SNC) es un conjunto organizado de células que procesan la información, elaborando respuestas. Está formado por células nerviosas de distintos tipos: las neuronas y las células gliales (Cajal, 1913; Cherniak, 1990; Lee et al., 2012).

### 1.1.1. Neuronas

Las neuronas (**Figura 1**), además de la membrana, el citoplasma y el núcleo, presentan una serie de prolongaciones que salen del cuerpo de la célula conocidas como dendritas y axón. Las dendritas son ramificaciones que permiten la conexión con otras células. Mientras el axón es una larga prolongación del cuerpo de la neurona, con ramificaciones al final. El axón también permite la comunicación con otras células mediante señales eléctricas y químicas. Se encuentra recubierto por las células de Schwann, ejerciendo una función aislante sobre el mismo debido a la mielina que contienen (Pavelka & Roth, 2010).



**Figura 1. Neuronas.** Grupo de neuronas teñidas con tinción de plata por Santiago Ramón y Cajal, conservado en el Museo Cajal.

El sistema nervioso permite una comunicación rápida y específica entre áreas muy distantes del organismo gracias a las neuronas. Éstas son células nerviosas especializadas que, debido a su capacidad de transmitir el impulso nervioso, son responsables de la transmisión de la información, recogiendo, procesando y generando, posteriormente, señales de respuesta adecuada. Constituyen así la unidad morfológica y funcional del cerebro.

Las neuronas son más vulnerables a sufrir daño que el resto de las células nerviosas y, concretamente, son muy sensibles al producido por especies reactivas de oxígeno. Esto es debido a sus bajos niveles de defensas antioxidantes y a la alta demanda de oxígeno para el mantenimiento del metabolismo a nivel cerebral (López-Muñoz *et al.*, 2006).

### **1.1.2. Células gliales**

Las células gliales, descritas por *Virchow* en 1846, son células conjuntivas estrelladas que rodean a los componentes nerviosos. Los dos tipos principales de células gliales en el SNC son: la microglía (encargada de la respuesta inflamatoria, constituyendo el sistema inmune del cerebro) y la macroglía, formada por los *oligodendrocitos* (responsables de la mielinización de los axones neuronales en el SNC, facilitando la rápida propagación del impulso nervioso) y los *astrocitos*, que son las células gliales de mayor tamaño y también las más abundantes (Bélanger & Magistretti, 2009; Tasker *et al.*, 2012).

Aunque la transmisión del impulso nervioso por las células neuronales es sin duda la función más relevante del SNC, las células de la glía desempeñan también una función muy importante tanto en condiciones normales como patológicas (Ramírez-Expósito & Martínez-Martos, 1998), no sólo como soporte de la estructura del sistema nervioso, sino como modulador y transmisor de las señales nerviosas (Kirchhoff *et al.*, 2001).

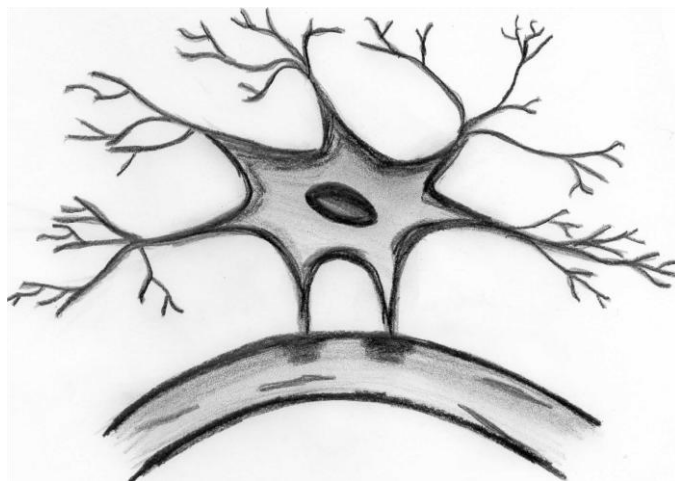
Los **astrocitos** (*Figura 2*) son las células no neuronales mayoritarias del SNC. Son de origen neuroectodérmico y representan más del 50% del total de las células de la corteza cerebral (*Chen & Swanson, 2003*). Presentan forma estrellada con un soma circunscrito al núcleo, del cual parten prolongaciones más o menos radiales demostradas por primera vez por *Santiago Ramón y Cajal* (*Cajal, 1913*).

Realizan importantes funciones fisiológicas, tanto durante su desarrollo como en el cerebro adulto, lo que permiten un adecuado funcionamiento de este órgano. Además de las funciones cerebrales, los astrocitos ejercen importantes funciones preventivas en condiciones desfavorables (*Sidoryk-Wegrzynowicz et al., 2011*). Así mismo, a diferencia de las neuronas, los astrocitos establecen contacto con los vasos sanguíneos, teniendo acceso a la glucosa que transportan hasta las neuronas (*Sofroniew & Vinters, 2010*). Además son capaces de almacenar glucógeno como fuente de energía (*Chen & Swanson, 2003*).

Se ha observado que los astrocitos no sólo son un soporte pasivo para las neuronas, sino que mantienen la estructura e integridad de la barrera hematoencefálica, son un soporte metabólico de las neuronas vecinas proveyéndolas de sustratos energéticos y actuando en la defensa inmunológica del SNC (*Janzer & Raff, 1987; Abbott et al., 2006; Markiewicz & Lukomska, 2006; Rouach et al., 2008*). Además, responden a las señales neuronales, regulan la neurogénesis, modulan su actividad sináptica regulando los niveles extracelulares de iones y neurotransmisores (principalmente el glutamato) en respuesta a un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$ , por tanto, presentan una actividad neuromoduladora (*Stevens, 2008; Ihrie & Alvarez-Buylla, 2008; Cina et al., 2009; Kosodo & Huttner, 2009*).

Se ha comprobado también que expresan multitud de receptores (*Araque, 2008*), regulan el pH extracelular manteniéndolo estable eliminando el  $\text{CO}_2$  que las neuronas generan, se encargan de la homeostasis hídrica y de iones, actúan durante el almacenamiento de información en el cerebro (*Navarrete et al., 2012*). Aparte poseen

un papel protector frente a la toxicidad de ROS, xenobióticos y metales al poseer sistemas enzimáticos específicos para su eliminación, presentando de este modo un papel neuroprotector que asegura el correcto funcionamiento del SNC (*Peuchen et al., 1997; Vega-Agapito et al., 2002*).



**Figura 2. Astrocito**, célula de aspecto estrellado cuyas prolongaciones están en contacto con un vaso sanguíneo (*dibujo del autor*).

### **1.1.3. Efecto neuroprotector de los astrocitos**

Las interacciones entre neuronas y astrocitos son muy importantes para la señalización, la homeostasis (al mantener el pH y el equilibrio iónico extracelular vital para el correcto funcionamiento cerebral), el metabolismo energético y la neuroprotección en el SNC frente a enfermedades neurodegenerativas (*Benarroch, 2005; Maragakis & Rothstein, 2006*).

Al igual que las neuronas, los astrocitos están constantemente expuestos a especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que origina que ambas células vean afectada su viabilidad en enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, la presencia de los astrocitos previene la muerte neuronal a causa del estrés oxidativo provocado por agentes oxidativos (*Heales et al., 2004*).

Fisiológicamente, la activación de las células gliales tras una lesión en el SNC, pretende minimizar las consecuencias nocivas ocasionadas, eliminando las células muertas y produciendo factores neuroprotectores. Esta función protectora que los astrocitos ejercen sobre las neuronas se produce cuando ambas células presentan uniones comunicantes (*Blanc et al., 1998*). Los astrocitos intercambian información en la sinapsis con las neuronas, ya que los astrocitos mantienen una comunicación bidireccional con las mismas, asegurando así su soporte estructural (al dar consistencia a las neuronas), metabólico (al estar implicada en la biosíntesis y catabolismo de los aminoácidos) y trófico (al aportar los nutrientes necesarios al contactar directamente con los vasos sanguíneos), a través de los neurotransmisores que presentan en la transmisión sináptica (*Kitamura et al. 1999a; Halassa & Haydon, 2010; Allaman et al., 2011; Ben Achour & Pascual, 2012*).

Además, durante el desarrollo, en la formación del tubo neural, los astrocitos favorecen la migración de las neuronas, sirviendo de guía para el crecimiento de los axones y produciendo factores de crecimiento y neurotróficos esenciales para el desarrollo y supervivencia de las neuronas.

Así mismo, algunos estudios demuestran que la capacidad antioxidante de las neuronas en cultivo es menor que la de las células gliales, las cuales son mucho más resistentes que las neuronas al daño producido por especies neurotóxicas (*Makar et al. 1994*). Esto puede ser debido a que las células gliales presentan una mayor concentración en glutatión reducido (GSH) (sistema antioxidante más eficiente del cerebro), además de aportar a las neuronas los precursores del mismo y de enzimas antioxidantes involucradas en el metabolismo del glutatión (*Steele & Robinson, 2012*). Los efectos neuroprotectores de los astrocitos son mediados por la transferencia del glutatión o sus precursores, a las neuronas. Cuanta mayor concentración de GSH haya en los astrocitos, existe una mayor capacidad de protección frente al daño neuronal producido por el estrés oxidativo (*Drukarch et al., 1997*).

Por tanto, la elevada concentración de enzimas antioxidantes presente en astrocitos puede proteger a las neuronas en condiciones de estrés oxidativo, habiéndose comprobado además en cocultivos *in vitro*, que los astrocitos protegen a las neuronas de la muerte inducida por peróxido de hidrógeno, siendo esta capacidad antioxidante mantenida a pesar del envejecimiento (*Desagher et al., 1996; Dringen, 2000; Liddell et al., 2010*).

Por todo lo expuesto anteriormente, parece de gran interés el estudio más detallado de las neuronas y de los astrocitos en situaciones de estrés oxidativo.

## 1.2. ESTRÉS OXIDATIVO

El término estrés oxidativo se refiere a la situación de *desequilibrio entre la generación de especies reactivas* (radicales libres y otras especies reactivas principalmente de oxígeno y nitrógeno) *y la capacidad de los sistemas de defensa antioxidante del organismo, a favor de los prooxidantes* (*Sies, 1985*).

Esto produce un potencial daño oxidativo que puede afectar tanto a las moléculas del organismo (proteínas, lípidos o ADN) como al propio funcionamiento fisiológico, produciendo una degeneración celular (*Gotz et al., 1994*). Este desequilibrio puede ser debido a un exceso de generación de especies prooxidantes, bien por aumento de su producción o bien por la disminución de su eliminación mediante sistemas de defensa antioxidantes, así como de reparación de los daños oxidativos producidos en las células, al verse las defensas antioxidantes desbordadas (*Mayne, 2003; Floyd & Hensley, 2003; Halliwell & Whiteman, 2004*).

Los sistemas de defensa antioxidantes endógenos enzimáticos (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa o hemo-oxigenasa) y no enzimáticos son los encargados de reparar los daños causados por las ROS.

Como consecuencia del daño oxidativo se puede producir excitotoxicidad y muerte celular, principalmente por apoptosis (Kerr *et al.*, 1972; Emerit *et al.*, 2004). La célula apoptótica sufre una serie de cambios morfológicos y posteriormente es fagocitada. De este modo, se eliminan las células dañadas, renovándolas y regulando su sistema inmune (Meier *et al.*, 2000).

Existen dos vías apoptóticas: intrínseca o mitocondrial y extrínseca o de receptores de muerte. Estos cambios fisiológicos son producidos por la activación de las enzimas reguladoras de la apoptosis: las caspasas, cisteína-aspartato-proteasas, iniciadoras (caspasas 2, 8, 9 y 10) y efectoras (caspasas 3, 7 y 6) (Green, 2000; Wang *et al.*, 2005). Un defecto en su regulación contribuye a la neurodegeneración a nivel neuronal y por tanto, al desarrollo de diversas enfermedades como la enfermedad de Alzheimer, de Parkinson, así como isquemia o el desarrollo del cáncer o enfermedades autoinmunes (Zimmermann *et al.*, 2001; Reed, 2002; Okouchi *et al.*, 2007).

Existen abundantes evidencias de que especies reactivas de oxígeno como el  $H_2O_2$ , inducen los procesos de apoptosis, que pueden ser inhibidos por los antioxidantes, constituyendo una estrategia terapéutica muy importante en la neuroprotección, como se ha observado en los astrocitos (Kitamura *et al.*, 1999b; Takuma *et al.*, 2004).

### 1.2.1. Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Las especies reactivas de oxígeno (ROS: *Reactive Oxygen Species*) son moléculas químicas reactivas derivadas de oxígeno molecular y que se producen en las células aerobias por reacciones redox. Este término incluye **radicales libres** y **especies no radicalarias** que son oxidantes y/o se convierten fácilmente en radicales libres, como por ejemplo  $ONOO^-$ ,  $^1O_2$ , o  $H_2O_2$  (Halliwell & Whiteman, 2004). Estas últimas por sí mismas no son reactivas, pero en presencia de metales de transición, como hierro o cobre, u otros radicales, generan radicales libres altamente reactivos, a través de



distintos mecanismos de señalización celular (Miller et al., 1990; Bergendi et al., 1999; Valko et al., 2006).

En condiciones fisiológicas las ROS se encuentran presentes a bajas concentraciones sin causar daño oxidativo en el organismo y manteniendo el estado redox, gracias a los mecanismos de defensa antioxidantes naturales celulares (las enzimas antioxidantes, entre ellos). Presentan un importante papel como elementos de regulación, como segundos mensajeros actuando en cascadas de señalización en numerosos tipos de comunicación y señalización intracelular, en la transducción de señales, expresión de genes, en proliferación y diferenciación celular, ayudando así a mantener la homeostasis a nivel celular, la síntesis de ADN, las modificaciones proteicas, la activación enzimática y la apoptosis.

Sin embargo, mientras que bajas concentraciones de ROS pueden estimular la proliferación y la supervivencia en muchos tipos de células, a altas concentraciones algunas especies, pueden ser perjudiciales para el organismo e incluso causar la muerte celular. Se produce daño oxidativo causado por la interacción de ROS con las distintas macromoléculas biológicas, como ácidos nucleicos, lípidos, proteínas e hidratos de carbono.

Se generan así reacciones en cadena por desequilibrio redox, lo que está implicado en diversas enfermedades degenerativas (Halliwell, 1997, Finkel & Holbrook, 2000, Dierckx et al., 2003, Ceriello et al., 2004; Valko et al., 2006). Así pues, el desequilibrio entre su generación y su neutralización puede conducir a un estado de estrés oxidativo que causa un daño irreversible de las células y más concretamente en las células nerviosas donde produce neurodegeneración (Halliwell, 2006).

#### ▪ **Radicales libres**

Se define radical libre como aquella *especie química independiente y muy reactiva que presenta uno o más electrones desapareados en su orbital más externo de valencia*

(Halliwell, 1994), lo cual la hace altamente reactiva, presentando de este modo una inestabilidad energética y una vida media corta (Miller et al., 1990; Jones, 2008).

Se generan en múltiples reacciones bioquímicas de óxido-reducción (redox), y tienden a estabilizarse reaccionando rápidamente su electrón desapareado con otro átomo de una molécula adyacente mediante reacciones redox. Participan en numerosos procesos biológicos del metabolismo celular (Halliwell, 1996; Droge, 2002; Fang et al., 2002).

- **El oxígeno**

El oxígeno es imprescindible en los procesos aeróbicos, no obstante las especies reactivas derivan en su mayoría de él, ya que una especie oxidante es capaz de aceptar electrones generando un desequilibrio electrónico con las moléculas que la rodean. Presenta principalmente forma molecular o diatómica ( $O_2$ ) (Beckman & Ames, 1998). Se estima que entre el 1-5% del  $O_2$  que consume la célula en condiciones normales, formará  $H_2O_2$ , pudiendo incrementarse esta proporción en condiciones anómalas (Chance et al., 1979).

- **Sistemas productores de ROS**

- Fuentes endógenas: Se producen constantemente como producto del metabolismo celular. La mitocondria es una de las mayores fuentes de producción de ROS de la célula, a través de mecanismos celulares, como el transporte de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial, inflamación, reacciones en cadena de peroxidación lipídica, en el metabolismo de xenobióticos, reacciones catalizadas del sistema enzimático del citocromo P-450 o la enzima hipoxantina/xantina oxidasa, la actividad de las enzimas nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADPH)-oxidasas (Lee et al., 2004; Valko et al., 2004; Le Bras et al., 2005).

- **Fuentes exógenas:** el humo de tabaco, la polución ambiental, los contaminantes ambientales, la radiación ultravioleta, el ozono, la metabolización de algunos fármacos o la actividad física intensa pueden contribuir a la producción de ROS, además de la dieta prooxidante o deficiente en antioxidantes (Beckman & Ames 1998; Carnevali et al., 2003; Kregel & Zhang, 2007).



**Figura 3. Estrés oxidativo.** El desequilibrio entre antioxidantes y prooxidantes, a favor de estos últimos produce un daño oxidativo en las células que afecta al material genético celular, lípidos, proteínas, así como a los hidratos de carbono (esquema del autor).

### 1.2.1.1. TIPOS DE ROS

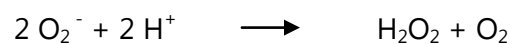
Las principales ROS se recogen en la **Tabla 1**:

Radicales		No Radicales	
Hidroxilo	$\cdot\text{OH}$	Peróxido de hidrógeno	$\text{H}_2\text{O}_2$
Superóxido	$\text{O}_2^{\cdot-}$	Oxígeno singlete	$^1\text{O}_2$
Peroxilo	$\text{ROO}^{\cdot}$	Peróxidos orgánicos	$\text{ROOH}$
Óxido Nítrico	$\text{NO}^{\cdot}$	Ozono	$\text{O}_3$
Hidroperoxilo	$\text{HOO}^{\cdot}$	Ácido hipocloroso	$\text{HClO}$
Dióxido de hidrógeno	$\text{NO}_2^{\cdot-}$	Peroxinitrito	$\text{ONOO}^{\cdot-}$

**Tabla 1. Nomenclatura de las principales especies reactivas de oxígeno (ROS), radicalarias y no radicalarias.**

- **Radical superóxido ( $O_2^-$ )**

Es el radical más abundante en el organismo a pH fisiológico. El anión superóxido es una especie poco reactiva, pero al generarse en gran cantidad inicia reacciones que producen otras ROS más reactivas y dañinas, como el radical hidroxilo. Es producto de diversas reacciones catalizadas por el oxígeno, al transferirse al mismo un electrón (McCord & Fridovich, 1969). El anión superóxido se dismuta rápidamente mediante la enzima superóxido dismutasa (SOD) produciendo peróxido de hidrógeno (Halliwell, 1991; Fujita et al., 2009):



- **Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )**

No es un radical libre al no presentar carga, ya que sus electrones se encuentran apareados. Sin embargo, es un componente importante dentro de la bioquímica de los radicales libres al participar en numerosas reacciones que originan radicales libres.

Las células consumen oxígeno constantemente y generan a su vez peróxidos, siendo el más abundante el peróxido de hidrógeno. Debido a su ausencia de carga difunde fácilmente a través de las membranas biológicas, tanto en medios hidrófobos como en medios acuosos, originando reacciones de oxidación y daño oxidativo celular, dando lugar a la muerte celular. Por tanto, se produce durante el metabolismo aeróbico celular por la reducción del  $O_2$ , así como por la acción de la enzima superóxido dismutasa en la transformación del anión superóxido. Se descompone fácilmente produciendo el radical hidroxilo, la ROS más reactiva (Deshpande et al., 2002).

El déficit de glutatión reducido puede disminuir el aclaramiento del  $H_2O_2$  y promover la formación de radicales. El  $H_2O_2$  es hidrolizado por la enzima catalasa y por la glutatión peroxidasa, principalmente en los astrocitos; además, también puede

reaccionar con el anión superóxido originando el radical hidroxilo mediante la reacción de Haber-Weiss (*Haber & Weiss, 1934*):



- **Radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ )**

Es considerada la especie química derivada del oxígeno más tóxica y reactiva, a pesar de su vida media de corta duración y de que no se difunde. Se puede originar mediante la lisis de  $\text{H}_2\text{O}$  o  $\text{H}_2\text{O}_2$  a través de radiaciones ionizantes, la reacción de Haber-Weiss, indicada anteriormente o en una reacción de reducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  catalizada por iones metálicos ( $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ) a partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (*Foresti & Motterlini, 1999*). El proceso más importante es la reacción de Fenton en la que intervienen iones de metales de transición como el hierro (*Fenton, 1894*):



Por tanto, los metales de transición juegan un papel muy importante en el daño oxidativo producido a nivel celular, ya que, aunque ni el radical superóxido ni el peróxido de hidrógeno producen daño “*per se*”, en presencia de los metales de transición generan el radical hidroxilo, que sí tiene la reactividad suficiente para producir daños en las células y a sus macromoléculas (*Gutteridge & Halliwell, 1989; Halliwell, 1997; Nguyen et al., 2008*).

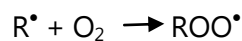
- **Oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ )**

El  $^1\text{O}_2$  no es realmente un radical libre, pero al encontrarse en forma excitada reacciona muy fácilmente con otras moléculas y es una importante molécula de señalización intracelular. Se forma al reaccionar en las moléculas de oxígeno o mediante reacciones de oxidación o enzimáticas. Puede iniciar la reacción que da lugar

a la peroxidación lipídica a partir de un ácido graso por su capacidad de sustraer  $H^+$  (Halliwell & Gutteridge, 1990).

- **Radical peroxilo ( $ROO^{\cdot}$ )**

Es uno de los radicales más abundantes formado a partir de hidroperóxidos orgánicos ( $ROOH$ ) por pérdida de  $H$ ; posee una vida media relativamente larga (del orden de segundos). Se origina por la adición del oxígeno a un radical hidrocarbonado (Kanner *et al.*, 1987).



- **Óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ )**

Es un gas hidrosoluble y lipofílico, con una importante función en los sistemas biológicos al regular el flujo sanguíneo, como neurotransmisor, así como por su importante acción antiinflamatoria e inmunitaria. Se sintetiza a partir de la arginina mediante una reacción enzimática catalizada por la óxido nítrico sintasa. Sin embargo, en exceso el óxido nítrico es citotóxico (Moncada & Palmer, 1991; Halliwell & Gutteridge, 1997).

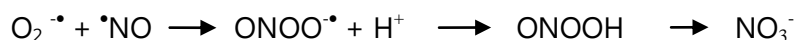
- **Dióxido de nitrógeno ( $NO_2^{\cdot}$ )**

Es un radical libre contaminante producido principalmente mediante la oxidación del  $NO^{\cdot}$  atmosférico. Inicia de manera eficaz la peroxidación lipídica (Halliwell, 1994; Postlethwait *et al.*, 1995).

- **Anión peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot-}$ )**

No es un radical, pero se trata de un potente intermediario oxidante altamente reactivo de grupos tioles, de la guanosina, fragmentando el ADN. Puede degradar los

hidratos de carbono e iniciar la peroxidación lipídica. Se puede generar a partir del óxido nítrico al reaccionar con el anión superóxido (*Miles et al., 1996*):



#### 1.2.1.2. DAÑO OXIDATIVO A LAS BIOMOLÉCULAS

Si bien el oxígeno es una molécula vital para los organismos vivos, en el metabolismo aeróbico se originan especies reactivas de oxígeno que son responsables de modificaciones importantes en las principales macromoléculas biológicas, como son los ácidos nucleicos, los lípidos, las proteínas y los hidratos de carbono (*Willcox et al., 2004; Dalle-Donne et al., 2006*).

Las ROS pueden reaccionar con estas biomoléculas, provocando daños acumulativos en las mismas e incluso la pérdida de su función. De este modo, se pone en riesgo la homeostasis, pudiendo incluso provocar la muerte de las células. La importancia de este ataque oxidativo depende de la intensidad del daño producido por las ROS y de la capacidad del organismo de reparar ese daño (*Floyd & Hensley, 2003*).

- **Daño oxidativo a ácidos nucleicos**

El daño oxidativo al material genético es el más importante a nivel celular al producirse daños en la información genética necesaria también para el resto de macromoléculas, además de ser el más difícil de corregir. Los ácidos nucleicos, en condiciones de estrés oxidativo, son susceptibles de sufrir modificaciones provocando la rotura de las cadenas de ADN y la oxidación de sus bases nitrogenadas, formándose el radical peroxilo en presencia de especies reactivas de oxígeno por adición del mismo a las bases o al azúcar del ADN y produciéndose mutaciones implicadas en la patología de muchas enfermedades asociadas a la edad avanzada y al cáncer (*Fraga et al., 1990; Beckman & Ames, 1998*).

El  $\text{HO}^\bullet$  y el  $\text{H}^\bullet$  son las principales ROS que reaccionan con las bases nitrogenadas del ADN, al oxidar tanto las bases púricas como las pirimidínicas y el azúcar desoxirribosa (Halliwell & Gutteridge, 1999). También se pueden formar puentes cruzados ADN-proteína (Cooke et al., 2003; Trachootham et al., 2008) al reaccionar los radicales  $\text{NO}^\bullet$  y  $\text{ONOO}^\bullet$  con las bases nitrogenadas del ADN. Cuando el peróxido de hidrógeno llega al núcleo, se produce la reacción de Fenton al reaccionar con el hierro y generar el radical hidroxilo (Valko et al., 2004).

El ADN mitocondrial es más susceptible al daño oxidativo que el ADN del núcleo, tanto por su cercanía a la cadena transportadora de electrones como por su menor capacidad de reparación contra el daño oxidativo. Cuando el daño oxidativo es moderado, el ADN puede activar mecanismos de reparación. Sin embargo, si el daño oxidativo es grande, las modificaciones oxidativas pueden producir cambios funcionales permanentes del material genético, por mutaciones en su ADN (Kregel & Zhang, 2007; Rao, 2009).

- **Daño oxidativo a lípidos**

Los lípidos forman parte de los constituyentes esenciales de las membranas biológicas, junto con las proteínas. Los lípidos de membrana son moléculas normalmente anfipáticas, con regiones hidrocarbonadas hidrofóbicas, que presentan poca afinidad por el agua y regiones polares hidrofílicas.

En las membranas, los lípidos más abundantes son los fosfolípidos, que regulan su fluidez y así mismo actúan como reserva metabólica. Estas membranas lipídicas de las células son muy susceptibles a la oxidación. Durante un ataque oxidativo, sus lípidos reaccionan con especies reactivas ( $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{HOO}^\bullet$ ,  $^1\text{O}_2$ ) en una reacción en cadena llamada peroxidación lipídica (Trachootham et al., 2008; Niki et al., 2005; Niki, 2012). Las especies reactivas son capaces de extraer un átomo de hidrógeno de un ácido graso saturado generando un radical lipídico ( $\text{R}^\bullet$ ), que reacciona con  $\text{O}_2$  originando un radical



peroxilo (ROO). Esta descomposición puede ser acelerada por la exposición a radiación ultravioleta o por la presencia de iones metálicos como el hierro y el cobre, a través de la reacción de Fenton (*Lee et al., 2004*).

Estos sucesos provocan una desestructuración física con una pérdida de la fluidez de las membranas celulares, así como de sus funciones secretoras y los gradientes iónicos transmembrana, esenciales para el correcto funcionamiento de las membranas biológicas. Se genera una mayor permeabilidad celular y porosidad de la membrana así como una inactivación de sus receptores.

Dentro de las biomoléculas lipídicas, los ácidos grasos poliinsaturados son los más susceptibles a este ataque (*Cross et al., 1987*). La peroxidación lipídica, por tanto, altera las membranas biológicas mediante un proceso autocatalítico producido por ROS, en el que los ácidos grasos poliinsaturados forman hidroperóxidos lipídicos, gases hidrocarbonados y aldehídos tóxicos como el malondialdehído (MDA) que es un indicador del daño oxidativo a lípidos. Como consecuencia se aumenta la viscosidad de la membrana, de modo que disminuye su resistencia eléctrica (*Cheeseman, 1993; Porter et al., 1995; Dalle-Donne et al., 2006*).

- **Daño oxidativo a proteínas**

Las proteínas constituyen uno de los principales componentes de los sistemas biológicos. Presentan un importante papel en gran variedad de funciones celulares, como por ejemplo: mantienen la estructura de las membranas y del citoesqueleto, regulan la señalización y la catálisis de las reacciones metabólicas en sistemas de transporte celular de metabolitos, interaccionan con receptores, y controlan el crecimiento y desarrollo del organismo.

Sin embargo, son susceptibles al ataque por especies reactivas, especialmente por el radical hidroxilo, debido a la presencia de cantidades significativas de

aminoácidos sulfurados o aromáticos en su estructura (*Frei, 1994*). La modificación oxidativa y degradación de las proteínas debido al ataque por especies reactivas de oxígeno origina alteraciones del funcionamiento biológico normal de la célula, produciendo daños oxidativos irreversibles en la regulación genética y metabólica, la transmisión de señales y la actividad enzimática (*Dalle-Donne et al., 2006*).

Esto puede conducir a la desnaturalización de la proteína y, por tanto, a una pérdida o modificación de su función biológica mediante reacciones en cadena. Estos efectos se asocian con la aparición y desarrollo de diversas enfermedades degenerativas relacionadas con el envejecimiento (*Devasagayam et al., 2004, Dalle-Donne et al., 2006; Belonogov et al., 2009*).

- **Daño oxidativo a hidratos de carbono**

Los hidratos de carbono se caracterizan por reaccionar fácilmente con los radicales hidroxilos, aunque en menor proporción que otras moléculas. Numerosos estudios demuestran que algunos polisacáridos actúan como agentes protectores frente al daño oxidativo producido en las células. Los monosacáridos y los disacáridos son resistentes a la acción de los radicales libres de oxígeno, mientras que los polisacáridos son despolimerizados por los mismos, produciendo pérdida de su función estructural (*Monboisse et al., 1988*). Algunos glúcidos como la manosa o manitol son capaces de reaccionar con el radical hidroxilo y eliminarlo (*Sies et al., 1985*). Existe de este modo, una relación directa entre las ROS y el estrés oxidativo en enfermedades como la diabetes mellitus.

### **1.2.2. Sistemas protectores frente al daño oxidativo**

En condiciones fisiológicas, los organismos mantienen un equilibrio entre la generación de ROS y su eliminación (prooxidante-antioxidante) mediante mecanismos de defensa antioxidantes celulares efectivos para contrarrestar la acción de las especies

oxidantes (Thomas, 2000; Devasagayam et al., 2004; Valko et al., 2007). Para la defensa del organismo las células han tenido que evolucionar y desarrollar mecanismos para sobrevivir al estrés oxidativo, manteniendo el nivel de antioxidantes.

Los **antioxidantes**, enzimáticos y no enzimáticos, *son sustancias que a bajas concentraciones* (comparadas con las del sustrato oxidable) *son capaces de retrasar o prevenir significativamente la oxidación de sustratos oxidables, protegiendo así al organismo frente al daño producido por el estrés oxidativo y reparando los daños producidos* (Gutteridge & Halliwell, 1989) (**Tabla 2**).

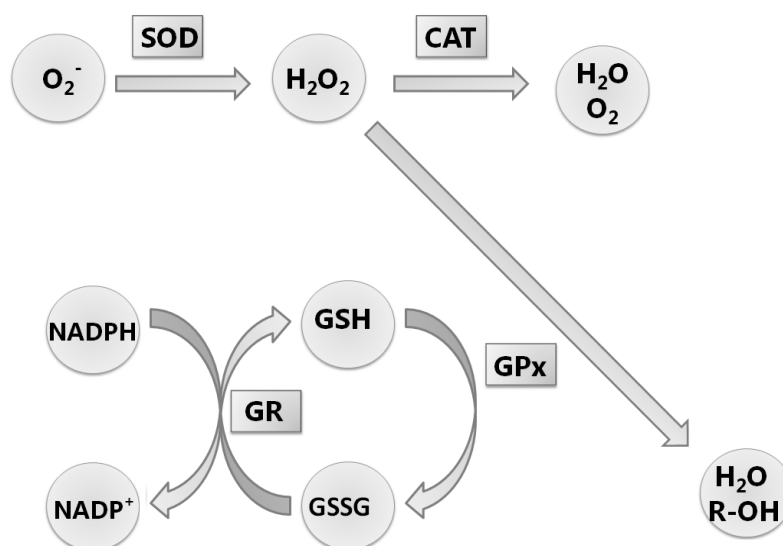
Antioxidantes
<ul style="list-style-type: none"><li>• Previenen la formación de ROS</li><li>• Aumentan la resistencia al ataque de ROS</li><li>• Eliminan ROS</li><li>• Reparar el daño causado por ROS</li><li>• Convierten los metabolitos reactivos en moléculas menos reactivas</li></ul>

**Tabla 2. Principales funciones de los antioxidantes**

El balance entre los agentes prooxidantes y antioxidantes determinará finalmente el estado redox, manteniendo un estado intracelular reducido.

#### **1.2.2.1. SISTEMAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS**

La actividad antioxidante de las enzimas frente a los altos niveles de ROS se regula mediante mecanismos de defensa intracelulares. Estas enzimas (**Figura 4**) son las encargadas de neutralizar y disminuir los niveles intracelulares de ROS en el organismo transformándolas en moléculas menos dañinas, y de reparar el daño producido por las mismas, manteniendo el estado redox y protegiendo al organismo frente a los agentes oxidantes (Halliwell, 2001; Pamplona & Constantini, 2011).



**Figura 4. Enzimas antioxidantes implicadas en la protección oxidativa.** Catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) son enzimas primarias de acción directa que eliminan ROS. Mientras, glutatión reductasa (GR) es una enzima secundaria, produce GSH y NADPH, que son cofactores para el buen funcionamiento de las enzimas primarias.

Sin embargo, estas enzimas reparadoras no pueden eliminar todas las lesiones y por tanto éstas se van acumulando y aumentando según la edad avanza. Dentro de los sistemas de defensa enzimática destacan las siguientes:

- **Enzima catalasa (CAT)**

La catalasa es una enzima tetramérica presente en todos los organismos aerobios, que se localiza principalmente en el citoplasma, mitocondria, peroxisomas, así como en otros orgánulos celulares. Presenta cuatro subunidades proteicas de 60 kDa cada una, las cuales contiene un grupo hemo (ferro [Fe (III)]-protoporfirina) unido a su centro activo.



Es una enzima muy eficaz que protege a las células frente a situaciones de estrés oxidativo. Su función es la eliminación de hidroperóxidos como el peróxido de

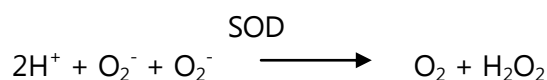
hidrógeno. No se satura por  $\text{H}_2\text{O}_2$  y lo descompone en agua y una molécula de oxígeno (Aebi, 1984). Esta enzima puede ser inhibida por azida o cianuro (Chance et al., 1979).

- **Enzima superóxido dismutasa (SOD)**

La enzima superóxido dismutasa (McCord & Fridovich, 1969) es la primera línea de defensa del organismo frente al daño oxidativo originado por los radicales libres, especialmente contra el radical superóxido. Está formada por dos subunidades proteicas con un centro activo. Constituye el mayor agente productor de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a partir del  $\text{O}_2^-$ , catalizando la conversión de este anión a  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2$ .

Se conocen tres isoformas de esta enzima en los seres humanos según la naturaleza del metal que forma su centro activo (Fridovich, 1974):

- SOD 1: Cu Zn SOD citosólica (dímero 32 kDa)
- SOD 2: Mn SOD mitocondrial (tetramero 96 kDa)
- SOD 3: Cu Zn SOD extracelular (tetramero 132 kDa)



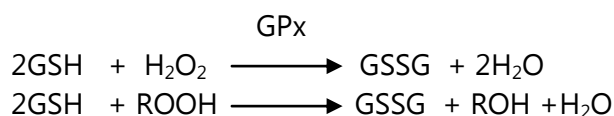
Se han publicado numerosos trabajos que demuestran la importancia de esta enzima como antioxidante (McCord, 2002; Fukai et al., 2002; Zelko et al., 2002; Fattman et al., 2003).

- **Enzima glutatión peroxidasa (GPx)**

Esta enzima es considerada como el principal sistema de defensa antioxidante a bajos niveles de estrés oxidativo. Está formada por cuatro subunidades idénticas, cada una con un residuo de seleniocisteína esencial para su actividad enzimática. Se han detectado cinco isoenzimas de GPx en mamíferos. Se localiza en el citosol y en la mitocondria.

Ejerce un papel importante en la detoxificación de hidroperóxidos como el peróxido de hidrógeno y los lipoperóxidos que se generan en las células (*Chance et al., 1979*). Es la principal enzima antioxidante para la detoxificación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ya que presenta mayor afinidad que CAT. Reacciona con los tejidos y otros hidroperóxidos orgánicos, catalizando su reducción mediante GSH, oxidándolo a GSSG (*Halliwell & Gutteridge, 2007*). De este modo protege a las células del daño producido por estrés oxidativo. Existen dos formas químicas de la enzima:

- Dependiente de selenio (*GPx-Se*) es un tetrámero (80 kDa) con un residuo de seleniocisteína en cada centro activo, se localiza principalmente en el citosol. Presenta una gran actividad frente al  $\text{H}_2\text{O}_2$  y los hidroperóxidos orgánicos (ROOH).
- Independiente de selenio (*GPx-no-Se*) es un dímero (19-25 kDa) que se encuentra en el citoplasma de las células, y presenta actividad frente a los peróxidos orgánicos (ROOH), reduciéndolos a formas más estables como los hidróxidos (ROH), utilizando como sustrato reductor al GSH que da lugar al glutatión oxidado (GSSG)

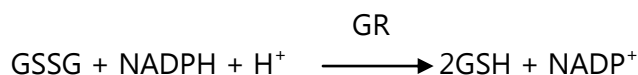


- **Enzima glutatión reductasa (GR)**

Es una enzima homodimérica (120 kDa) que presenta un importante papel en el metabolismo del GSH. Está formada por dos subunidades proteicas con flavina en su centro activo. Se encuentra predominantemente en el citosol celular, aunque presenta también cierta actividad en la mitocondria.

Protege a la célula contra los radicales libres y peróxidos, para lo que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) mediante la nicotina adenina dinucleótido

fosfato (NADPH), procedente de la ruta metabólica de la vía oxidativa de las pentosas fosfato (Powers & Lennon, 1999). Reduce los hidroperóxidos orgánicos tipo ROOH- y mantiene, junto con NADPH, el nivel de GSH elevado (Hopkins & Elliot, 1931; Tandogan & Ulusu, 2006):



- **Enzima hemo-oxigenasa (HO)**

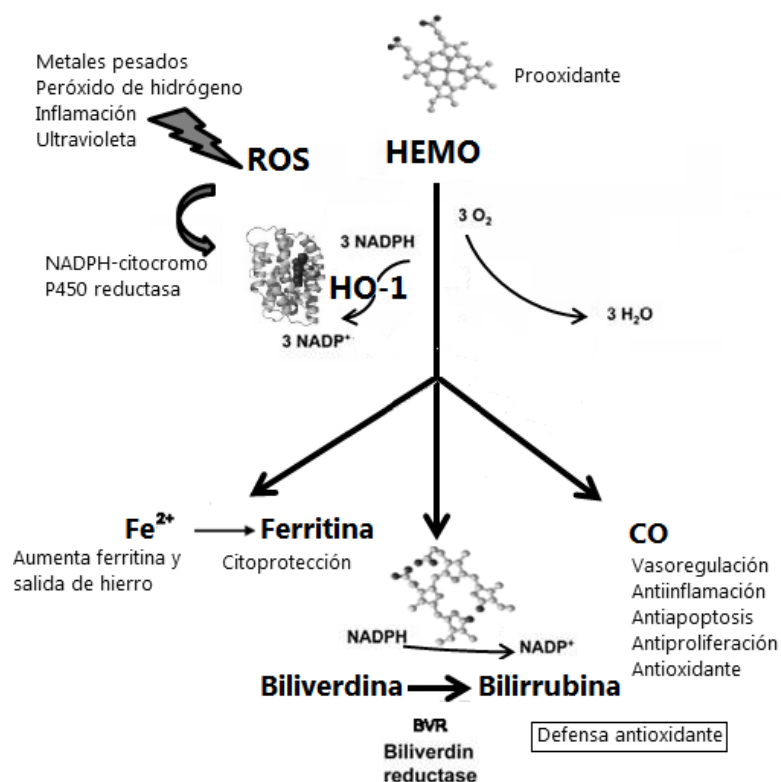
La HO fue descubierta en 1968 cuando *Tenhunen* y colaboradores describieron el mecanismo de la reacción para el catabolismo del grupo hemo, siendo esta enzima la que cataliza la degradación oxidativa del mismo (Morse & Choi, 2005). Sin embargo, el sistema hemooxigenasa-biliverdina-reductasa (HO-BVR) se ha descrito recientemente como antioxidante.

Existen diversas isoformas de HO, producto de distintos genes:

- *HO-1* (32 kDa) es inducible por diversos estímulos de estrés celular como metales pesados, citoquinas, endotoxinas, shock térmico, grupo hemo, peróxido de hidrógeno, hiperoxia, e hipoxia. Además, es una enzima que ejerce funciones citoprotectoras previniendo el daño oxidativo (Tenhunen et al., 1968; Gems et al., 1974; Maines & Kappas, 1974; Maines et al., 1986; Keyse & Tyrrell, 1989; Lee et al., 1997; Minamino et al., 2001; Shibahara et al., 2003; Kapturczak et al., 2004; Kim et al., 2004).
- *HO-2* está expresada en forma constitutiva en la mayoría de los tejidos: cerebro, hígado, bazo y testículos (Trakshel & Maines, 1989; Maines, 2005).
- *HO-3* es una isoforma constitutiva. Comparte un 90% de homología con *HO-2* y fue detectada únicamente en cerebro de rata (Elbirt & Bonkovsky, 1999; McCoubrey et al., 1997).

La hemo-oxigenasa 1 es una enzima microsomal primaria de acción indirecta, fase II, que cataliza la degradación del grupo hemo, formando hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ), monóxido de carbono (CO) y biliverdina que posteriormente se convierte por biliverdin reductasa (BVR) en bilirrubina, un potente antioxidante intracelular relacionado con el balance redox celular (Tenhunen et al., 1968; Motterlini et al., 1996; Deshane et al., 2005; Kim et al., 2006; Abraham & Kappas, 2008) (**Figura 5**). La reacción requiere de  $\text{O}_2$  y usa la enzima NADPH-citocromo P-450 reductasa para transportar electrones desde el NADPH al complejo (Kikuchi et al., 2005).

La expresión de HO-1, en respuesta al grupo hemo y en respuesta a gran número de estímulos que se producen en situaciones de estrés, ha estado asociada con un efecto citoprotector en varios modelos *in vitro* e *in vivo* (Ryter et al., 2002) y es probable que represente un instrumento intermediario para la citoprotección activando otros procesos adaptativos (Ryter et al., 2004; Farombi & Surh, 2006).



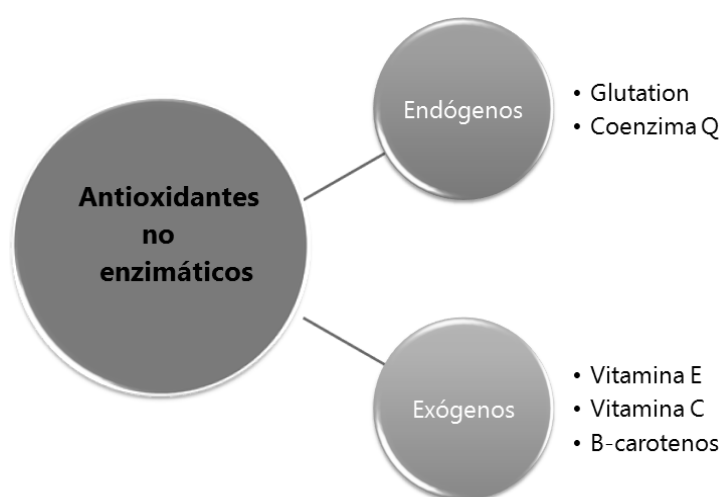
**Figura 5. Esquema de la interacción de la hemo-oxigenasa 1 (HO-1), en el sistema para la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (Modificado de Clarck & Sharp, 2006).**



Esto es debido a la capacidad de HO-1 de degradar el grupo hemo evitando así los efectos prooxidantes del mismo, protegiendo a las células frente a un aumento de ROS, y por tanto, contra el daño oxidativo (Stocker *et al.*, 1987; Maines *et al.*, 2001; Baranano *et al.*, 2002; Juang, 2004; Nie *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007). Existen estudios en los que se observa que los astrocitos inducen la expresión de esta enzima (Min *et al.*, 2006). Así mismo, se ha estudiado el efecto neuroprotector de la HO-1 frente a  $H_2O_2$  (Kaizaki *et al.*, 2006).

#### 1.2.2.2. SISTEMAS ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS

Los sistemas de defensa antioxidante no enzimáticos están constituidos por moléculas de bajo peso molecular con capacidad antioxidante (**Figura 6**). Constituyen la primera línea de defensa frente a ROS, además de complementar la actividad de las enzimas antioxidantes. Son sistemas captadores de especies reactivas o captadoras, que enlentecen las reacciones de oxidación en cadena o atrapan a las ROS transformándolas en sustancias menos agresivas y reparando los daños producidos (Wang *et al.*, 2006). Presenta, por tanto, una función protectora frente a las ROS.



**Figura 6. Sistemas antioxidantes no enzimáticos.** Existen dos tipos, los producidos endógenamente por el organismo y los aportados exógenamente.

- **Sistema Glutación**

El glutatión (L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinglicina) es el principal tiol no proteico celular y es considerado el principal antioxidante no enzimático endógeno de la célula (*Masella et al., 2005*). Este tripéptido hidrosoluble está formado por los aminoácidos: ácido glutámico, glicina y cisteína, a través de los cuales se sintetiza en el citosol.

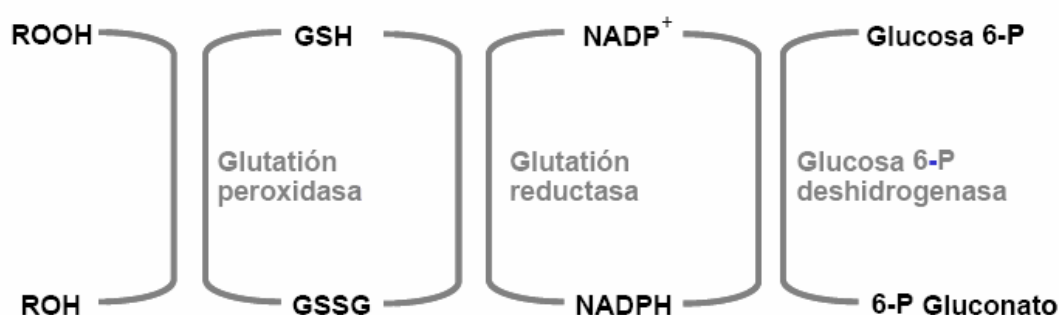
Presenta una importante función metabólica en las células, relacionada con su protección antioxidante frente al ataque oxidativo, debida a la capacidad reductora del grupo tiol de su cisteína, que interviene en reacciones redox, intercambiando electrones a través del azufre de la cisteína. El glutatión libre está presente principalmente en su forma reducida (GSH), la cual pasa a forma oxidada (GSSG) en situaciones de estrés oxidativo (**Figura 7**). Según su estado de oxido-reducción el glutatión se encuentra como:

- glutatión reducido (GSH), protege a la célula contra los radicales libres, gracias al grupo activo sulfhidrilo del residuo de cisteína, que actúa como donador de protones. Representa la primera barrera de protección frente al estrés oxidativo y regula la síntesis de proteínas y ADN. Presenta una función antioxidante importante al eliminar los peróxidos orgánicos y el peróxido de hidrógeno en reacción catalizada por GPx. Los cerebros deficientes de glutatión son más susceptibles al daño producido por la liberación de ROS (*Sies, 1986; Takebe et al., 2002*).
- glutatión oxidado (GSSG) se produce cuando dos moléculas de GSH se oxidan, cediendo un electrón cada una y uniéndose por un puente disulfuro entre cisteínas.

Aunque la mitocondria es el sitio principal de producción de ROS, el GSH no puede ser sintetizado en este orgánulo. Se transporta desde el citosol, donde tiene lugar la síntesis, para minimizar los daños por oxidación, y mantener la integridad de la

membrana. En condiciones de estrés oxidativo, el GSH capta ROS y se oxida a GSSG por una reacción catalizada por la GPx (Sies, 1986; Bains & Shaw, 1997; Morris et al., 2008).

El GSSG formado es inmediatamente reducido a su vez a GSH por la GR con la ayuda del cofactor Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (NADPH), que es suministrado por la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa. De esta forma, la concentración de GSSG a nivel celular se mantiene en niveles bajos (Schafer & Buettner, 2001; Olivero, 2011).



**Figura 7. Glutatión.** Síntesis de glutatión reducido y oxidado.

- **Ácido úrico**

Es el producto final del metabolismo de las purinas. La dieta es una importante fuente de ácido úrico, ya que la ingestión de purinas hace que éstas sean transformadas por la xantina oxidoreductasa en la mucosa intestinal a ácido úrico. Este actúa como un antioxidante y como quelante de metales de transición al captar el oxígeno singlete y las ROS (Howell & Wyngaarden, 1960). Por su unión al hierro o cobre, puede inhibir las reacciones de oxidación catalizadas por estos metales. Elimina eficazmente los derivados reactivos del oxígeno como el superóxido y el radical hidroxilo e intermediarios oxigenados del grupo hemo, ejerciendo una protección antioxidante (Nieto et al., 2000).

- **Bilirrubina**

Es un tetrapirrol lineal (unido a la albúmina) y producto final de la degradación del grupo hemo. Es un antioxidante liposoluble que capta los radicales peroxilo, inhibiendo la lipoperoxidación. Se oxida a biliverdina al captar radicales hidroperóxido que finalmente se reduce para dar la bilirrubina (*Clark & Sharp, 2006; Abraham & Kappas, 2008*).

- **Coenzima Q (ubiquinol)**

La coenzima Q es la forma predominante de ubiquinona, lípido de síntesis endógena en la cadena respiratoria mitocondrial. La forma reducida de la ubiquinona es el ubiquinol, que es un importante antioxidante intracelular, eficaz frente a ROS que también participa en la recuperación de la vitamina E.

- **Vitamina A**

También conocida como retinol es derivada del  $\beta$ -caroteno, con gran capacidad para captar ROS. Principalmente actúa a nivel de las membranas lipídicas (*Biesalski et al., 1996*).

- **Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol)**

La vitamina E es una molécula fenólica y lipofílica. Es el principal antioxidante en las membranas biológicas debido a su alta liposolubilidad, siendo su actividad muy significativa a nivel del SNC (*Burton et al., 1990*). Se encuentra en las membranas celulares y en lipoproteínas plasmáticas protegiendo a los lípidos de la oxidación al unirse a las ROS y bloqueando la cadena de reacciones producidas en la peroxidación lipídica (*Burton & Ingold, 1989; Pryor, 2000*). Además, capta radicales peroxilo lipídicos produciendo hidroperóxidos lipídicos y radical tocoperoxilo (*Zadák et al., 2009*).

- **Vitamina C (ácido ascórbico)**

Este antioxidante hidrosoluble (Sies *et al.*, 2005) y de bajo peso molecular se obtiene directamente de la dieta y es uno de los antioxidantes naturales más importantes, más efectivos y menos tóxicos. Se encuentra presente tanto a nivel intracelular como extracelular. Actúa sobre el anión superóxido, peróxido de hidrógeno, oxígeno singlete y radical hidroxilo. Se encarga de la regeneración de los tocoferoles (Kojo, 2004; Zadák *et al.*, 2009).

- **Carotenos**

Los carotenos son pigmentos naturales con elevada actividad antioxidante y gran capacidad para dar lugar a reacciones de eliminación de O<sub>2</sub> singlete debido a sus largas cadenas de dobles enlaces conjugados. Protegen a las membranas contra el daño oxidativo al bloquear la cadena de reacciones de peroxidación. El β-caroteno puede actuar sinérgicamente con α-tocoferol inhibiendo la peroxidación lipídica provocada por los radicales libres (Krinsky, 1989; Sies & Stahl, 1995; Young & Lowe, 2001).

### **1.2.2.3. Nrf2-ARE**

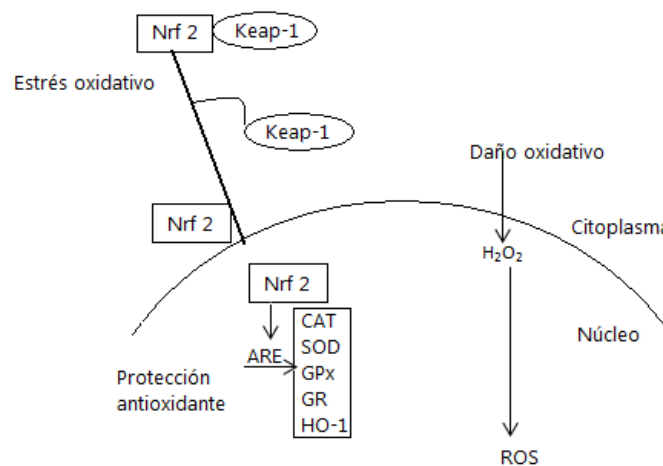
Nrf2-ARE es sistema endógeno citoprotector que desarrolla un papel clave en la modulación del sistema de defensa antioxidante de la célula, así como en los procesos de proliferación y supervivencia celular (Bell *et al.*, 2011; Neymotin *et al.*, 2011; Joshi & Johnson, 2012). Nrf2 es el factor de transcripción eritroide-2 nuclear que se une a ARE, elemento de respuesta antioxidante. ARE es un elemento regulador que es lugar de unión de diversos factores de transcripción sensibles a estrés oxidativo como Nrf2.

Considerando que la expresión de las enzimas antioxidantes está regulada por Nrf2 nuclear, por unión a la secuencia específica del ADN de ARE, Nrf2 es esencial en la expresión de proteínas detoxificantes de fase II, de antioxidantes y de genes. Actúa coordinando la inducción de genes que codifican enzimas citoprotectoras o de

respuesta a diversos estímulos de estrés oxidativo (CAT, SOD, GST, GPx, HO-1), así como en funciones antiinflamatorias (Gupta et al., 2012).

En un estado de equilibrio redox, Nrf2 se encuentra en el citoplasma de la célula unido a dos moléculas de Keap-1, proteína que dirige la degradación de Nrf2.

En situaciones de estrés oxidativo como la presencia de ROS, Nrf2 se disocia de Keap-1 mediante la oxidación de los grupos tiol y se transloca al núcleo. En el núcleo, Nrf2 dimeriza con proteínas de la familia Maf y se une al ARE para inducir la expresión de enzimas antioxidantes (**Figura 8**). Dado el importante papel del Nrf2 en la expresión de los antioxidantes enzimáticos, una alteración en la modulación de su vía de señalización puede ser crucial en la iniciación de procesos degenerativos. La modulación de la vía Nrf2/ARE constituye una atractiva diana terapéutica para protección frente a las enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Parkinson o la de Alzheimer (Li et al., 2009; Joshi & Johnson, 2012).



**Figura 8. Activación del Nrf2.** Nrf2 se encuentra unido a dos moléculas de proteína Keap 1 (que dirige la degradación del Nrf2) en el citoplasma en condiciones de equilibrio redox. En respuesta al estrés oxidativo se disocia Nrf2 de Keap 1, Nrf2 se transloca al núcleo, se dimeriza con proteínas de la familia Maf y se une a la localización promotora específica de ARE, induciendo la expresión de las enzimas antioxidantes y de las enzimas que participan en la síntesis de glutatión. Se produce así, un efecto protector frente al estrés oxidativo (Modificado de Joshi & Johnson, 2012).

### **1.3. ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS ASOCIADAS AL ESTRÉS OXIDATIVO**

El estrés oxidativo se encuentra implicado en la patogénesis de numerosas enfermedades crónicas como la arteriosclerosis, la hipertensión arterial (*Harrison & Gongora, 2009*), la diabetes mellitus (*Friederich et al., 2009*), el cáncer (*Khandrika et al., 2009*), isquemia-reperfusión (*Niizuma et al., 2009*), problemas en la fertilidad (*Makker et al., 2009*), enfermedades cardiovasculares o neurodegenerativas (*Golden & Patel, 2009*) como la esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer (*Reddy et al., 2009; Rao, 2009*), Parkinson y en enfermedades autoinmunes e inflamatorias como la artritis reumatoide, o el daño causado por el ejercicio físico intenso (*Mayne, 2003; Halliwell & Whiteman, 2004*).

Se encuentra también asociado al proceso normal del envejecimiento (*Gilca et al., 2007*), entendiendo este como una acumulación en el tiempo de diversos cambios biológicos producidos por ROS entre otros agentes y un peor funcionamiento de las defensas antioxidantes, que disminuyen la funcionalidad de las células, resultando en un aumento del riesgo de enfermedad y muerte, al ser más vulnerables frente a condiciones patológicas asociadas al estrés oxidativo (*Melo et al., 2011*).

El sistema nervioso central es especialmente vulnerable al daño oxidativo. Este daño producido por especies radicalarias derivadas del oxígeno se acumula con el tiempo y produce una pérdida gradual de la capacidad funcional de la célula. La disfunción mitocondrial, la apoptosis y la sobreproducción de ROS presentan un mecanismo común en la patogenia del envejecimiento y de las enfermedades neurodegenerativas (*Gilgun-Sherki et al., 2001; Emerit et al., 2004*).

El cerebro y especialmente las neuronas son vulnerables a la oxidación provocada por el ataque de ROS, ya que para su metabolismo requiere grandes cantidades de oxígeno (facilitando la generación de especies reactivas, por ejemplo el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). Su

contenido en glutatión es bajo (Sian *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 2004) y posee menor contenido de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos; además, genera enzimas prooxidantes, como peroxidasas, en las neuronas afectadas (Choi *et al.*, 2005). Por otro lado, es susceptible de sufrir peroxidación lipídica debido a que sus membranas son ricas en ácidos grasos poliinsaturados (Sayre *et al.*, 2008).

### **1.3.1. Enfermedades neurodegenerativas**

Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo heterogéneo de enfermedades del sistema nervioso que poseen etiologías diferentes, y frecuentemente se relacionan con el envejecimiento (Everse & Coates, 2009). Se caracterizan por la progresiva atrofia o muerte de las células del sistema nervioso, provocada por daños en la célula a causa de alteraciones mitocondriales, inflamación, mutaciones genéticas o agregados inadecuados de proteínas, que conduce a la muerte neuronal tras un deterioro progresivo.

Entre los principales **factores causantes** de la aparición de esta neurodegeneración se encuentra el envejecimiento, asociado a la acumulación progresiva de daños en las biomoléculas por su metabolismo oxidativo. También los factores ambientales pueden producir y agravar la degeneración y muerte celular, entre los que destaca el estilo de vida y el tipo de dieta seguida (consumo de tabaco, alcohol, drogas), contaminación ambiental, exposición a agentes tóxicos como determinados metales, insecticidas o pesticidas. Finalmente, no podemos olvidar los factores genéticos que también han demostrado tener un importante papel en la aparición de estas enfermedades degenerativas. El incremento en la generación de ROS y el efecto que producen podría explicar en parte, el origen y desarrollo de estas enfermedades.

En estudios *in vitro* e *in vivo* y análisis post-mortem de cerebros humanos procedentes de pacientes con enfermedad de Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y enfermedad de Huntington se han detectado elevados niveles de ROS, de



marcadores de la peroxidación lipídica y un desequilibrio en su sistema enzimático y no enzimático (Ramalingam & Kim, 2012).

#### **1.3.1.1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

La enfermedad de Alzheimer fue descrita por primera vez por el médico alemán *Alois Alzheimer* en 1907. Es la demencia más prevalente en la población mayor de 65 años ya que, en esta enfermedad neurodegenerativa el envejecimiento es el factor de riesgo más importante. Se caracteriza clínicamente por un progresivo e irreversible deterioro de la función cognitiva, asociada con una pérdida neuronal masiva. Las ROS incrementan el estado prooxidante de forma prolongada (Halliwell, 2009).

Los astrocitos presentan modificaciones funcionales en la enfermedad pudiendo tener un impacto negativo en la función neuroprotectora de estas células (Verkhatsky et al., 2010; Dumont & Beal, 2011; Steele & Robinson, 2012). Neuropatológicamente los cerebros de los pacientes afectados con esta enfermedad muestran placas amiloides y ovillos neurofibrilares (Reddy et al., 2009; Nath et al., 2012). Así mismo, presentan un aumento de la peroxidación lipídica. Las proteínas  $\beta$ -amiloides causan daño neuronal debido a la acumulación de ROS, disminuyendo la viabilidad de las células. Existen evidencias de la implicación del estrés oxidativo en el desarrollo temprano de la enfermedad de Alzheimer (Su et al., 2008; Axelsen et al., 2010).

#### **1.3.1.2. ENFERMEDAD DE PARKINSON**

La enfermedad de Parkinson fue descrita por primera vez por el médico inglés *James Parkinson* en 1817. Es el segundo desorden neurodegenerativo más frecuente y afecta principalmente a población mayor de 60 años. Se caracteriza por un deterioro crónico y una pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas que contienen neuromelanina en la sustancia negra, con una acumulación de cuerpos de Lewy (inclusiones proteínicas intracitoplasmáticas) (Jenner & Olanow, 1996).

Se ha observado que los niveles de especies reactivas en la sustancia negra son mucho más elevados en los enfermos de Parkinson. Esta enfermedad se caracteriza por temblor en reposo, rigidez, bradiquinesia e inestabilidad en el equilibrio (*Ziemssen & Reichmann, 2007*).

#### **1.3.1.3. ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA**

La esclerosis lateral amiotrófica es una enfermedad degenerativa de las neuronas motoras superiores e inferiores, altera de forma progresiva y letal a las células del asta anterior y a la vía corticoespinal (*Dhib-Jalbut et al., 2006*). Se manifiesta con una debilidad muscular progresiva en miembros y cara, amiotrofia, espasticidad, hiperreflexia y finalmente compromiso respiratorio y muerte. Aproximadamente el 10% de los casos se heredan de manera autosómica dominante, estos pacientes tienen mutaciones en el gen de la CuZnSOD que hace que aumente la generación de ROS (*Gros-Louis et al., 2006*).

#### **1.3.1.4. ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**

La enfermedad de Huntington, o Corea de Huntington, fue descrita por *George Huntington* en 1872, está determinada genéticamente de forma autosómica dominante por una mutación del trinucleótido CAG cromosómico (*Browne & Beal, 2006*). Esto es resultado de la degeneración de un grupo de neuronas GABAérgicas (del ácido  $\gamma$ -aminobutírico) en los ganglios basales generados por defectos metabólicos. Al aumentar ROS y disminuir el ATP se produce un aumento de los niveles del neurotransmisor excitatorio glutamato en estas neuronas que son muy sensibles al efecto neurotóxico. Se caracteriza por la pérdida de neuronas neostriatales. Se desarrollan de forma progresiva anormalidades en la conducta, alteraciones cognitivas, demencia progresiva y movimientos espasmódicos involuntarios.

De forma general, el mantenimiento del equilibrio redox es una necesidad vital para los seres vivos, y la pérdida de esta función produce un deterioro progresivo (Calabrese *et al.*, 2007). La importante contribución del estrés oxidativo en la patogenia de diversas enfermedades neurodegenerativas ha incitado la búsqueda de tratamientos para mejorar y prevenir los daños producidos en el organismo. En los últimos años las investigaciones han llevado a un enorme avance en el conocimiento de estas enfermedades neurodegenerativas, cuyo objetivo principal es impedir la degeneración neuronal, conservando la actividad y funciones normales de las células, ejerciendo un efecto neuroprotector sobre las mismas (Vajda, 2002). Sin embargo, es necesario profundizar en los mecanismos moleculares que conducen al desarrollo de cada una de estas enfermedades, y de esa forma desarrollar estrategias terapéuticas más precisas que ayuden a evitar la progresión del proceso neurodegenerativo pero sobre todo que ayuden a erradicar estas enfermedades.

En este contexto, resulta esencial la búsqueda de compuestos antioxidantes que ejerzan una función protectora frente al estrés oxidativo y que puedan convertirse en herramientas terapéuticas válidas frente a estas enfermedades. La naturaleza representa una fuente importante de compuestos biológicamente activos, con una relevancia significativa para el tratamiento de diversas patologías. La vía Nrf2-ARE se constituye como una importante diana para el tratamiento de estas enfermedades al regular el sistema antioxidante endógeno (Joshi & Johnson, 2012)

## **2. *SALVIA LAVANDULIFOLIA* VAHL.**

### **2.1. GÉNERO *SALVIA* L.**

La familia Lamiaceae (= Labiatae), formada por 200 géneros y unas 3000 especies, se encuentra ampliamente distribuida. Dentro de esta familia está el género *Salvia* L., que es el género que presenta mayor diversidad específica y se encuentra constituido por alrededor de 900 especies (Topcu, 2006), entre las que se incluye la especie objeto de estudio: *Salvia lavandulifolia* Vahl.

Este género es originario del área Mediterránea; sin embargo, se distribuye prácticamente por todo el mundo. Es abundante en Europa, a lo largo del área Mediterránea, en el Sureste de Asia, y en América Central y Sudamérica donde se encuentran más de la mitad de las especies (Gali-Muhtasib et al., 2000; Walker et al., 2004).

Se caracterizan por ser plantas herbáceas y perennes, aunque algunas son bianuales y todas aromáticas. Crecen espontáneas en todo tipo de suelos de zonas templadas y cálidas, pero preferentemente en terrenos montañosos con suelo calizo y arenoso-calcáreo (pH aproximado 6,5) entre 400 y 2000 m de altitud; ocasionalmente también se siembran pequeñas parcelas de cultivo (Marcos et al., 1988; Karamanos, 2000). Sus hojas son simples o compuestas y las inflorescencias están formadas por verticilastros, con cáliz campanulado y corola bilabiada (Sáez, 2010). La época de floración varía entre abril y julio (Rosua & Blanca, 1986).

Todas las salvias presentan una composición química compleja, siendo los principales constituyentes fitoquímicos del género los terpenos y los polifenoles (principalmente flavonoides) (Cañigüeral et al., 1989; Zarzuelo et al., 1995). Se trata de un género que contiene elevadas concentraciones de aceite esencial, presentando una alta variabilidad en su rendimiento entre las diferentes especies, así como en la

composición de los mismos debido a factores como la distribución geográfica, el tipo de suelo, las horas de luz, el régimen hídrico al que se encuentra sometida la planta o la variabilidad estacional (Palacio et al., 2008).

El interés del género *Salvia* L. (del latín *salvare*: salvar) radica en que a diversas especies del género se les ha atribuido numerosas propiedades curativas en la medicina tradicional (Blumenthal et al., 2000). Su reputación medicinal es conocida desde la antigüedad por egipcios, griegos, romanos, indios americanos y especialmente en la medicina tradicional China como promotora de la salud, el tratamiento de diversas enfermedades y como "planta para la longevidad". El científico y naturista Plinio (23-79 dC) citaba la *Salvia* como potenciadora de la memoria. Mientras que el médico y botánico griego Dioscórides (40-90 dC) usaba este género para tratar las úlceras y heridas abiertas. Se le atribuían tantas virtudes que la Escuela de Salerno en el siglo XIII consideraba: "*cur moriatur homo cui salvia crescit in horto?*" (¿De qué podrá morir el hombre que tiene salvia en el huerto?) (Font Quer, 1999).

Las diferentes especies del género *Salvia* L. muestran una gran variedad de actividades biológicas que ponen de manifiesto su diversidad. De este modo su consideración de panacea para el tratamiento de diversas afecciones llega hasta nuestros días. También se utiliza en medicina tradicional en todo el mundo para tratar la epilepsia, en el tratamiento de la tos e infecciones bucales, bronquitis, tuberculosis, hemorragias, y dolores menstruales (Dweck, 2000; Topcu, 2006; Ramos et al., 2010); así como por sus propiedades antiséptica, astringente, depurativa, digestiva, expectorante, antipirética, y también para uso externo como insecticida y para infecciones de la piel (Jirovetz et al., 2007). Algunas especies son también conocidas por poseer otras propiedades farmacológicas, como antiinflamatoria, antidiabética, antimicrobiana o ansiolítica; además de antiespasmódica, antimalárica, anticancerígena y antifúngica (Kelen & Tepe, 2008; Loizzo et al 2009).

La acción farmacológica comprobada científicamente se atribuye a los componentes presentes en el género que pueden agruparse como se ha comentado en: polifenoles, derivados diterpénicos y aceite esencial, siendo este último el responsable de algunas de las propiedades más interesantes relacionadas con el género *Salvia*.

Algunas de las especies de este género tienen una larga historia de uso en el tratamiento de gran variedad de trastornos como, por ejemplo, los que afectan al sistema nervioso central y particularmente en el tratamiento de la demencia, confirmando el uso tradicional de este género en afecciones del sistema nervioso central (*Imanshahidi & Hosseinzadeh, 2006*). En numerosos estudios publicados se recoge su actividad sobre la memoria, como agentes potenciadores de la misma, así mismo demuestra efectos beneficiosos en la depresión y en la isquemia cerebral (*Howes et al., 2003; Akhondzadeh et al., 2003; Perry et al., 2003; Kennedy et al., 2006*).

Desde la antigüedad se ha empleado la *Salvia* como especia, pero no sólo por su capacidad de mejorar el aroma y sabor de los alimentos, sino también por favorecer la conservación de los mismos, lo que es debido a sus propiedades antioxidantes (*Guillén & Ibargoitia, 1995; Topcu, 2006; Porres-Martínez et al., 2012*). Esto justifica su uso comercial como aromatizante de alimentos en la industria; además, también se usa para formulaciones cosméticas.

## **2.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE SALVIA LAVANDULIFOLIA VAHL.**

*Salvia lavandulifolia* Vahl. (**Figura 9**) es nativa de la Península Ibérica, ese es el motivo por el que su nombre común es Salvia española. Pertenece al género más común que crece en la región, *Salvia* L. (**Tabla 3**).



**Figura 9.** *Salvia lavandulifolia* Vahl. (imagen del autor).

Clasificación	taxonómica
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Lamiales</i>
Familia	<i>Lamiaceae</i>
Subfamilia	<i>Nepetoideae</i>
Tribu	<i>Mentheae</i>
Género	<i>Salvia</i>
Especie	<i>S. lavandulifolia</i>
Nombre científico	<i>Salvia lavandulifolia</i> Vahl

**Tabla 3.** Clasificación taxonómica de *Salvia lavandulifolia* Vahl.

**Sinónimos:**

Salvia española, marisielva, madreSelva, blanquilla, jalvia, salvia fina de hoja estrecha, manisierVa, salvia de Aragón, salvia de la Alcarria, salvia menor o sierva.

## 2.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

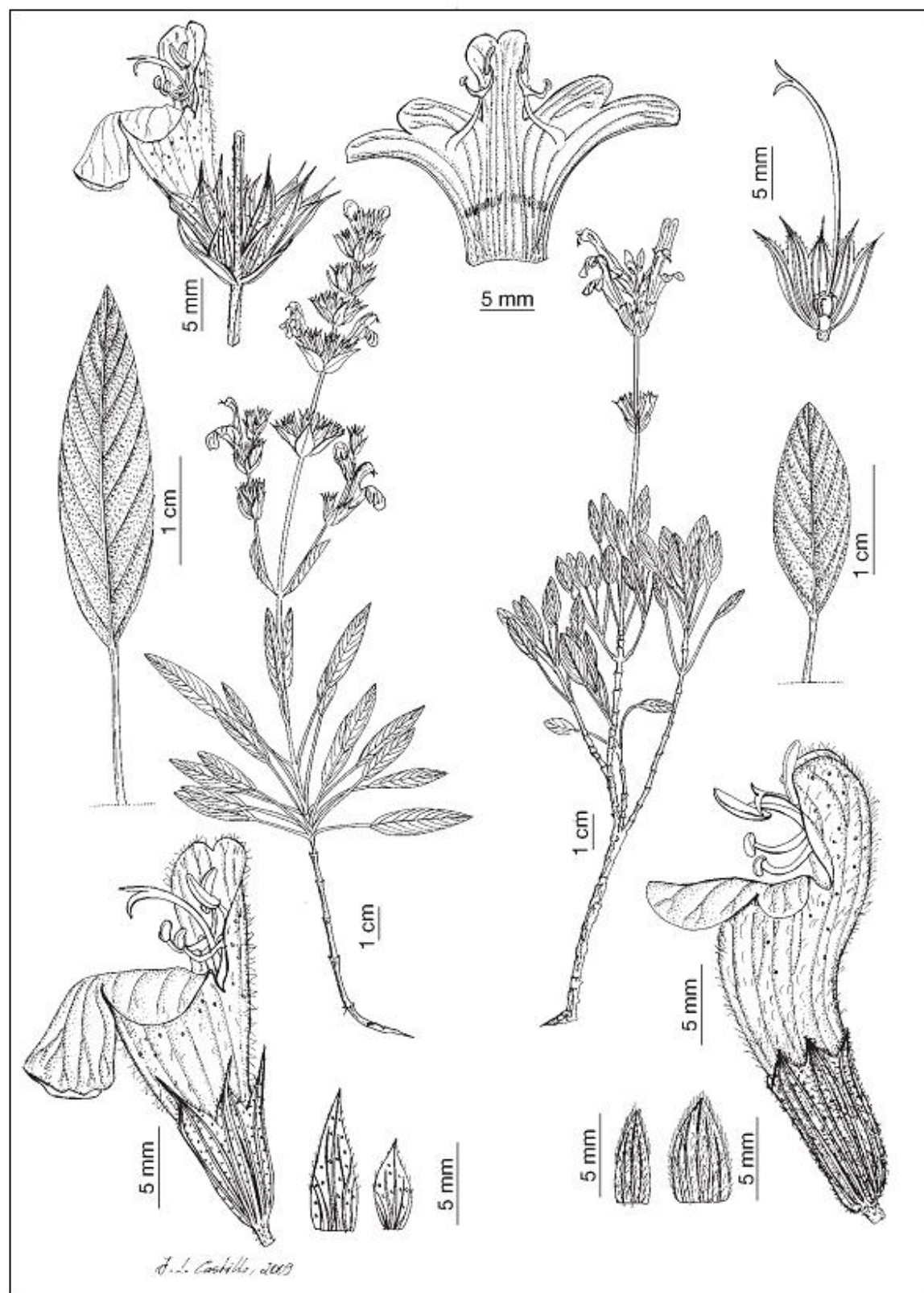
### ▪ Descripción morfológica

*Salvia lavandulifolia* (**Figura 10**) es un subarbusto aromático con tallos ramificados, que puede alcanzar entre 17 y 100 cm de altura. Presenta una densidad variable de pelos tectores de 0,05-2 mm y a veces glandulares de 0,1-1 mm con glándulas esferoidales sésiles. Sus tallos son leñosos en la base, con numerosas ramificaciones herbáceas y pubescentes de forma ascendente o erecta.

Las hojas (50 mm) son opuestas, simples, pecioladas (5-54 mm), con las nerviaciones muy marcadas y a veces en forma de racimos. Son de color verde o grisáceo claro. Las hojas presentan un dimorfismo estacional como una estrategia para evitar las tensiones principales del clima mediterráneo: la sequía del verano y el frío del invierno (*Palacio et al., 2006*). La floración se produce hacia finales de primavera principios de verano (mayo-julio), siendo las inflorescencias (5-71 cm) simples o ramificadas; con 2-8 flores que se agrupan en el extremo de las ramas, con apariencia de espigas.

Las brácteas son ovaladas, de color verde o violeta. El cáliz mide 8-14 mm, verde o púrpura violeta. La corola (15-40 mm) pubescente es de color rosado, púrpura o azul violeta, de hasta 25 mm de longitud, abierta en dos labios en su parte distal: el superior tiene forma de casco y está formado por dos pétalos mientras que el inferior lo forman tres pétalos tal y como se describe en *Flora Europaea* (*Hedge, 1972*) y en *Flora Ibérica* (*Sáez, 2010*). El androceo se encuentra fusionado con la corola y formando dos estambres. El mejor carácter diferencial es la forma del cáliz bilabiado en *S. officinalis* y, regular y cilíndrico en *S. lavandulifolia*. Dada su variabilidad, su disposición, tamaño y tipo de hojas, son menos característicos (*Valdés-Bermejo & López, 1977*). Su particular morfología hace que los insectos, para acceder al néctar, tengan que entrar en contacto con las tecas fértiles, favoreciendo así el proceso de polinización entomológica (*Pérez, 2005*).





**Figura 10.** *Salvia lavandulifolia* Vahl (Sáez, 2010).

### ▪ **Subespecies**

La especie *S. lavandulifolia* es un taxón muy polimorfo e intraespecífico del que se han descrito numerosas subespecies. En su origen, durante el Mioceno, el grupo debió extenderse por el norte de África y la Península Ibérica. Siendo esta microevolución de la especie posible gracias al aislamiento de las poblaciones, lo que produjo una diversidad de biotipos (Rosua & Blanca, 1990). En la actualidad, las subespecies se distribuyen geográficamente desde el suroeste de Marruecos hasta la parte mediterránea de Francia, delimitadas según los caracteres morfológicos de la planta (Rosua & Blanca, 1986).

En base a sus numerosas diferencias morfológicas, pertenecen a un único quimiotipo, caracterizado por sus principales componentes en concentración variable:  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol y alcanfor (Karamanos, 2000). Todas las subespecies se caracterizan por presentar un número cromosómico idéntico ( $2n=14$ ) y un cariotipo bastante similar (Rosua & Blanca, 1985).

Estas subespecies de *Salvia lavandulifolia* descritas a continuación, han sido estudiadas por diversos autores a lo largo de toda la geografía de España (Valdes-Bermejo & López, 1977; Rosua & Blanca, 1985; Fernández et al., 1986; Figuerola, 1987; Donaire et al., 1992; Hervás et al., 1997), concluyendo que es necesario realizar un estudio profundo de los taxones, ya que existe una gran variabilidad incluso en las mismas localizaciones.

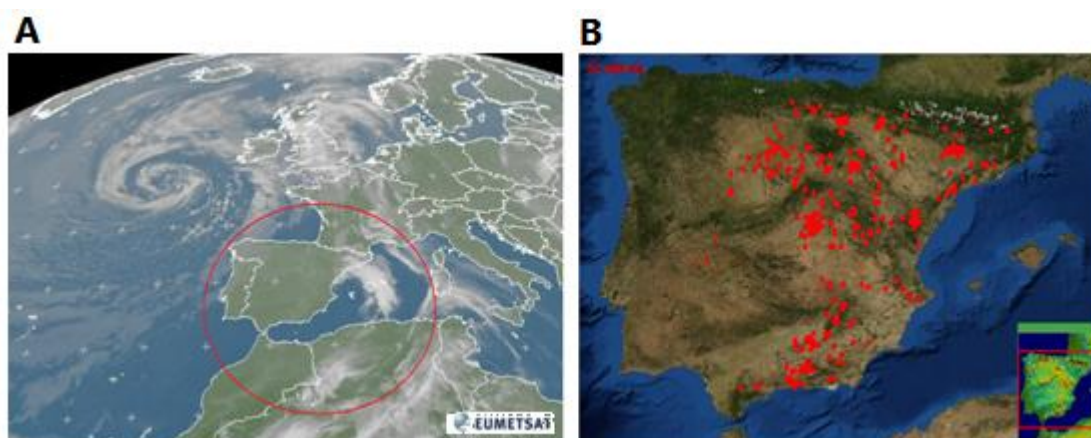
- Subsp. *lavandulifolia*. Es la subespecie endémica de España más extendida; crece en el centro y este del país, en matorrales, calizas, margas o yesos; a una altitud de 250-2100 m. Es un subarbusto de 17-65 cm, con hojas simples. Sus inflorescencias de 7-18 cm presentan verticilastros de 5-7 flores (mayo-julio). Se caracteriza por su cáliz glabrescente de 5-8 mm con dientes de menos de 3 mm, sus pelos son tectores. Las poblaciones de los Pirineos centrales y orientales fueron clasificadas y publicadas como *S. lavandulifolia* subsp. *pyrenaeorum* debido a su similitud.

- Subsp. *vellerea* (Cuatrec.) (Rivas Goday & Rivas Mart.). Es también endémica de España; es un subarbusto de 25-70 cm que crece en sustrato calizo, margoso o dolomítico a 300-2.100 m en el este y sur de España. Presenta unas brácteas persistentes y un cáliz con unos dientes de 3-5 mm, pelos largos y en su mayoría glandulíferos aunque también tectores. Sus hojas son simples, con pelos glandulares, la corola de 25-30 mm, rosa o azul violeta. La inflorescencia es simple, de 5-27 cm, con verticilastros de 4-8 flores (mayo-julio). Es el quimiotipo que presenta mayor proporción de acetato de sabinilo (Pages et al., 1992). Existen ejemplares intermedios entre esta subespecie y la subsp. *lavandulifolia*.
- Subsp. *oxyodon* (Webb & Helder). Crece en el sureste de España en sustrato calizo a 700-2100 m. Es un subarbusto de 20-95 cm, con hojas simples, cáliz glabrescente, pelos tectores y dientes de más de 3 mm. Su inflorescencia mide 5-40 cm con verticilastros de 5-7 flores (mayo-julio). La corola mide 24-30 mm y presenta un color azul violeta (Almería, Jaén, Málaga y Murcia) (Crespo et al., 1986).
- Subsp. *blancoana* (Webb & Helder). Es una especie de sierras subéticas de España y del norte de Argelia, que crece entre los 700-1800 m de altitud en sustrato calizo. Es un subarbusto de 40-100 cm, de hojas simples. Su inflorescencia mide 14-71 cm, es abierta y ramificada; sus pelos son glandulares; con verticilastros de 2-6 flores, cáliz con pelos glandulares abundantes y corola 25-40 mm, rosada (Crespo et al., 1986; López, 2006).
- Subsp. *mariolensis* (Figueroa) (Alcaraz & De la Torre). Crece en matorrales y roquedos en sustrato calizo, a 700-1400 m en el este de España. Es un subarbusto de 15-50 cm. Su cáliz posee dientes y pelos glandulares y tectores. Las brácteas son caedizas, sus hojas generalmente son simples, con inflorescencia de 5-20 cm, simple normalmente y con verticilastros de 2-6 flores (junio-julio). La corola mide 21-28 mm, con color rosa o azul violeta. Es una subespecie que morfológicamente está estrechamente relacionada con la subsp. *vellerea*.

Debido a su morfología de carácter rastrero, *S. lavandulifolia* puede ser una planta eficaz como protectora del suelo, reduciendo la erosión producida por el agua (Durán et al, 2006). Teniendo en cuenta esta característica y la producción de biomasa anual, la intensidad de recolección recomendable para esta especie sería del 50%. Presenta así mismo una excelente capacidad de adaptación a las condiciones ecológicas, por eso puede ser recomendada como cultivo alternativo en áreas con posibles cambios de uso de suelos agrícolas. Protege la estabilidad de los mismos y los riesgos de erosión (Pérez, 2005; Durán et al, 2008).

## 2.4. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

*Salvia lavandulifolia* es una especie endémica de la Península Ibérica, en la que diferentes factores históricos, geográficos, geológicos y climáticos han influido sobre su distribución actual. Se encuentra muy extendida por el área Mediterránea, principalmente en el este de España (especialmente en Andalucía, Murcia y Castilla) (Figura 11) y por el Mediterráneo Occidental: Sureste de Francia y norte de África (Marruecos y Argelia) (Jordán et al., 2009; Sáez, 2010).



**Figura 11. Distribución geográfica de *S. lavandulifolia*** (Imágenes tomadas de (A) Satélite [www.meteosat.com](http://www.meteosat.com) y (B) de [www.anthos.es](http://www.anthos.es) (Anthos, 2012)).

Las variaciones morfológicas de la especie, en relación a su distribución geográfica, son más o menos complejas (Reales et al., 2004). Antiguamente era considerada una subespecie de *S. officinalis* (Cañigual et al., 1998) debido, probablemente, a que se encuentra muy cercana taxonómicamente a la misma, que es propia del Mediterráneo oriental, mientras que *S. lavandulifolia* se localiza en el Mediterráneo occidental (Pérez, 2005).

## 2.5. HÁBITAT

*Salvia lavandulifolia* es una especie muy bien adaptada al clima semiárido Mediterráneo. Crece preferentemente en substratos rocosos, poco profundos, calcáreos o yesíferos, a altitudes de 350 a 2000 m sobre el nivel del mar (Marcos et al., 1988; Sáez, 2010). En la mayoría de los casos crece espontánea, aunque ocasionalmente también se cultiva en parcelas. Se desarrolla de manera óptima a pleno sol con un buen drenaje (Crespo et al., 1986; Pages et al., 1992).

## 2.6. COMPOSICIÓN QUÍMICA

*S. lavandulifolia* muestra una gran variabilidad en la proporción de sus componentes químicos, muchos de ellos identificados (Cañigual et al., 1989; Zarzuelo et al., 1995; Lu & Foo, 2002). El estudio de la composición química de la planta indica la presencia de flavonoides, triterpenos (derivados del ácido oleanólico y ursólico) (Sajewicz et al., 2009; Mathé et al., 2010), y monoterpenos (Johnston & Beart, 2004), normalmente presentes en las partes aéreas (flores y hojas); mientras que los diterpenos (derivados del abitano y pimarano principalmente) son los compuestos mayoritarios encontrados en las raíces (Escudero et al., 1983; Michavila et al., 1986; Baricevic & Bartol, 2000; Ulubelen, 2000; Topcu, 2006).

- **Aceite esencial**

Bajo la denominación de aceite esencial, esencia o aceite volátil, la "*International Standard Organization*" (ISO), define como: "*Conjunto de productos volátiles que se obtienen de materiales naturales por destilación con agua o en corriente de vapor, por un proceso mecánico de extrusión, con posterior separación de la fase acuosa*".

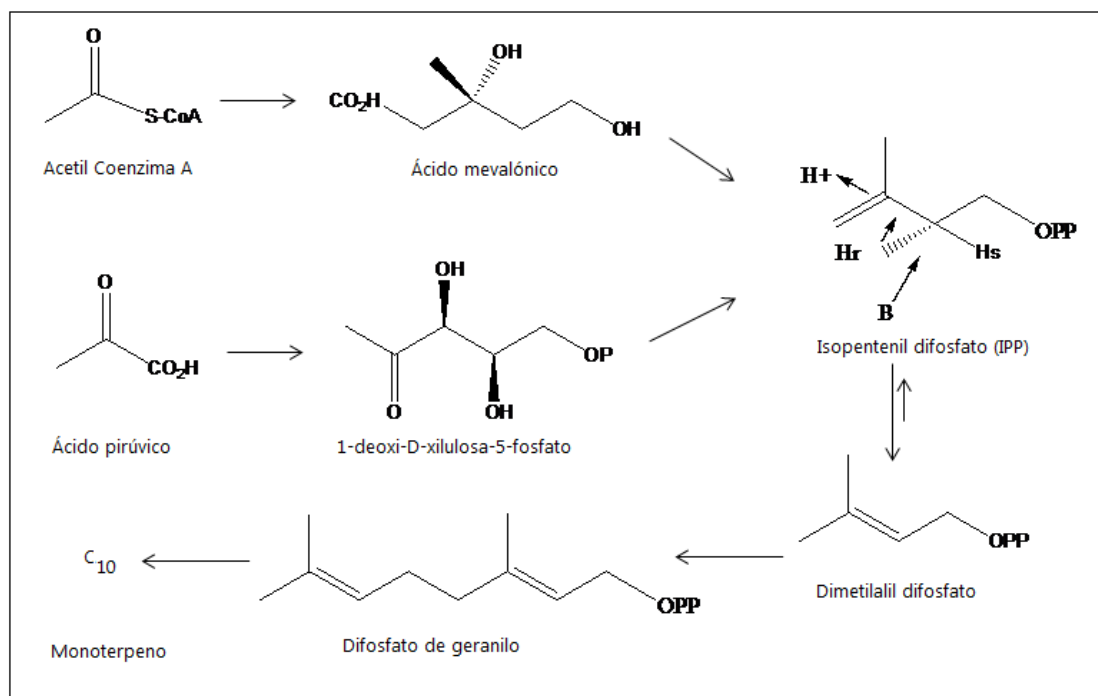
De forma general, los aceites esenciales son mezclas complejas, líquidas, volátiles, con propiedades aromáticas, extraídas, en el caso de las especies de *Salvia*, de las hojas y flores. A temperatura ambiente, gran parte de ellos son una mezcla químicamente compleja de compuestos aromáticos, líquidos oleosos, insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos.

Los componentes del aceite esencial proceden del metabolismo secundario de las plantas y son biosintetizados en diversos órganos de especies aromáticas. Los aceites volátiles de *Salvia* suelen presentar más de 100 componentes individuales a diferentes concentraciones.

El aceite esencial de *S. lavandulifolia* se caracteriza por presentar un aspecto líquido oleoso a temperatura ambiente, color amarillo claro o casi incoloro y olor característico, alcanforado. Es una mezcla de gran número de componentes terpénicos (Font Quer, 1999; Bruneton, 2001), sintetizado en los tricomas de las hojas y almacenados en los pelos glandulares de las partes aéreas (Giannouli & Kintzios, 2000; Ennajar et al., 2010).

Los terpenos son metabolitos secundarios que derivan del isopreno  $[(C_5H_8)_n]$ . Entre ellos los monoterpenos, que incorporan dos unidades de isopreno ( $C_{10}$ ) y son las moléculas más representativas de los aceites esenciales (Panagiotopoulos et al., 2000b) (**Figura 12**).

El aceite esencial de *S. lavandulifolia* se compone principalmente por hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos así como aldehídos, éteres, alcoholes, ésteres, fenoles, cetonas y óxidos.

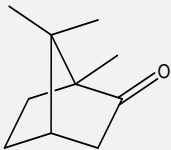
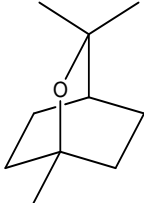
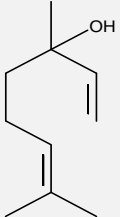
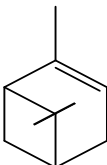
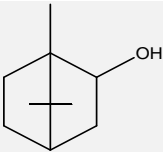
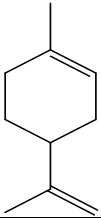


**Figura 12. Síntesis de los monoterpenos.**

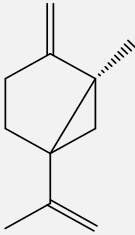
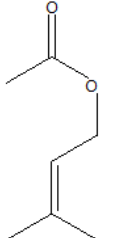
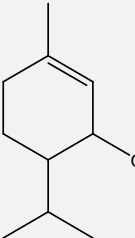
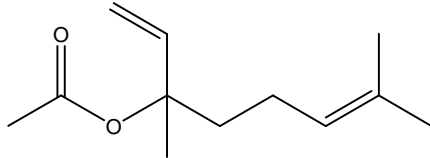
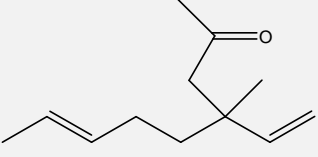
La variación en el porcentaje de los componentes del aceite esencial ofrece características importantes a la hora de clasificar cada ejemplar (Santos-Gomes & Fernandes-Ferreira, 2001). Varios autores han determinado mediante análisis fitoquímico la composición de diferentes muestras del aceite esencial de *S. lavandulifolia*, concluyendo que los componentes químicos mayoritarios son terpenos volátiles (Lawrence et al., 1970; Guillén & Ibargoitia, 1995; Guillén & Manzanos, 1999; Perry et al., 2000a; Savelev et al., 2003; Cardile et al., 2009; Jordán et al., 2009; Herraiz Peñalver et al., 2010). Su perfil cromatográfico fue dado en la 8ª edición de la Farmacopea Francesa (1965), citado por Bruneton (2001): éteres como 1,8-cineol o eucaliptol (11-25%); cetonas bicíclicas como alcanfor (11-36%); hidrocarburos bicíclicos como  $\alpha$ -pineno (4-11%), sabineno (0,1-3%), limoneno (2-5%); alcoholes acíclicos como

linalol (0,5-9%); alcoholes bicíclicos como borneol (1-8%); ésteres acíclicos como acetato de linalilo (<5%) y alcohol monocíclico como terpin-1-en-4-ol (<2%). Así mismo, carece o no posee apenas tujonas (<0,5%).

La composición indicada por la Norma de la *Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR, 2001)* para *S. lavandulifolia* se representa en la **Tabla 4.**

Monoterpeno	Estructura química	%
Alcanfor		15-36
1,8-cineol (eucaliptol)		11-30
Linalol		0,3-4
$\alpha$ -pineno		4-11
Borneol		1-5
Limoneno		2-5



<b>Sabineno</b>		0,1-3
<b>Acetato de <math>\alpha</math>-terpenilo</b>		0,5-9
<b>Terpinen-4-ol</b>		<2
<b>Acetato de linalilo</b>		0,1-5
<b>Acetato de sabinilo</b>		0,5-9

**Tabla 4. Constituyentes (%) determinados en el aceite esencial de *Salvia lavandulifolia* mediante cromatografía de gases (UNE 84310:2001) (AENOR, 2001).**

*S. lavandulifolia* está muy bien adaptada a las condiciones ambientales del área Mediterránea (Bernáth & Németh, 2000). Sin embargo, la gran variabilidad intraespecífica de su composición química se observa en ejemplares pertenecientes a la misma población espontánea (Jordán et al., 2009). Esto es debido tanto a factores medio ambientales como son: intensidad de la luz, fotoperiodo, temperatura, clima o condiciones estacionales, como a características ecológicas del hábitat de crecimiento,

densidad, lugar de recolección, localización geográfica, régimen hídrico, frecuencia de recolección, estado fenológico, periodo vegetativo de crecimiento, edad y factores genéticos de la planta (Panagiotopoulos et al., 2000a). Esta diferencia fitoquímica puede influir en su riqueza y calidad produciendo cambios en la actividad de la planta (Crespo et al., 1986; Hay, 1993; Guillén & Ibargoitia, 1995; Guillén et al., 1996; Perry EK et al., 1999; Santos-Gomes & Fernandes-Ferreira, 2001; Amiri, 2007; Kamatou et al., 2008; Ozkan et al., 2010).

El rendimiento del aceite esencial puede aumentar bajo condiciones de estrés como temperaturas elevadas o baja fertilización, debido al papel protector de los metabolitos secundarios (Hay, 1993). Así mismo se ha observado que el aceite esencial se encuentra en elevada concentración en plantas que crecen en condiciones soleadas, siendo máxima en las hojas, intermedia en las flores y mínima en los tallos. Por otro lado, a pesar de las variaciones cuantitativas que se producen en los componentes principales del aceite esencial de un año en relación al siguiente, este se caracteriza por la presencia mayoritaria de  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol y alcanfor en las sumidades floridas del vegetal (Pérez, 2005).

## 2.7. ETNOFARMACOLOGÍA

*Salvia lavandulifolia* ha sido utilizada por la humanidad desde hace más de dos milenios para el tratamiento de diferentes desórdenes cognitivos relacionados con la edad. El herborista inglés John Gerard (1545-1607) escribió en 1597 acerca del género *Salvia*, "es singularmente buena para la cabeza y el cerebro, y revitaliza los nervios y la memoria". Unos 50 años más tarde, en 1652, el médico inglés Nicholas Culpeper (1616-1654) escribió "también sana la memoria, calentando y agilizando los sentidos." John Hill (1714-1775), en 1756, dijo "*Salvia* en los últimos años de vida, preservará facultades y memoria, más valioso a la mente racional que la vida misma" (Perry et al, 2000b; Houghton, 2004).

*S. lavandulifolia* se ha utilizado en la medicina tradicional como remedio popular por sus propiedades terapéuticas para tratar numerosas enfermedades (Crespo *et al.*, 1986), como antiespasmódico, antimicrobiano, antiviral y fungicida, además de analgésico, sedante, antiinflamatorio y anestésico local. Las hojas de *S. lavandulifolia* son mencionadas como colerético, astringente, cicatrizante y antiséptico (Cañigüeral *et al.*, 1989; Zrira *et al.*, 2004) y también antitranspirante para el tratamiento de la hiperhidrosis de manos, pies y axilas.

Estas indicaciones tradicionales han incluido efectos beneficiosos sobre el sistema nervioso central, principalmente en el estado de ánimo y la memoria. Esta planta medicinal también se ha utilizado por sus propiedades psicoactivas. Así mismo en el tratamiento de los síntomas de la menopausia y para trastornos menstruales.

El aceite esencial de la planta es rico en compuestos no sólo con actividad antimicrobiana y antiviral, sino también con propiedades antioxidantes. La subespecie *lavandulifolia* se emplea en medicina popular como hipotensor y digestivo por vía interna.

Esta especie aromática se ha utilizado frecuentemente también por su importante papel en la conservación de los alimentos debido a las propiedades antisépticas de sus terpenos, sesquiterpenos y derivados oxigenados (Guillén & Manzanos, 1999) y como saborizante (Dweck, 2000).

## 2.8. ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA

- ***Salvia lavandulifolia* Vahl**

Numerosas investigaciones revelan que *S. lavandulifolia* presenta importantes propiedades farmacológicas estudiadas tanto *in vitro* como *in vivo*, y confirmadas en ensayos clínicos; validando su uso tradicional.

En estudios farmacológicos *in vitro* se ha observado que los extractos etanólicos presentan efectos antioxidantes débiles comparados con el estándar antioxidante galato de propilo, a la concentración de 10  $\mu$ M, y una leve inhibición de la síntesis de eicosanoides, produciendo un 10% de la inhibición de la síntesis del tromboxano-B<sub>2</sub>. Sin embargo, ejerce una inhibición superior al 60% de la síntesis de los leucotrienos B<sub>4</sub>. Así mismo, se observa una actividad concentración dosis-dependiente, en la fracción soluble en agua (Perry *et al.*, 2001).

También se ha observado que extractos acuosos de *S. lavandulifolia* protegen al ADN contra el daño celular inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células HeLa, mediante la estimulación de los sistemas de defensa antioxidante. Así mismo, diterpenos fenólicos como el carnosol o el rosmadol son también responsables de esta actividad antioxidante (Ramos *et al.*, 2010).

Por otro lado, se ha observado en estudios *in vivo* en ratas Wistar, que los extractos acuosos de la parte aérea de la subespecie *oxydon* poseen actividad antidiabética e hipoglucemiante, mediante la reducción de los niveles de glucosa a través de la liberación de insulina y produciéndose una hiperplasia de las células  $\beta$ -pancreáticas, con incremento de la captación periférica de glucosa e inhibición de su absorción intestinal (Zarzuelo *et al.*, 1991; Jiménez *et al.*, 1995).

Los extractos etanólicos de *S. lavandulifolia* presentan propiedades inhibitoras de la enzima colinesterasa. Esta actividad es muy relevante en el tratamiento de los trastornos cognitivos asociados con el envejecimiento, como el Alzheimer (Mantle *et al.*, 2000; Wake *et al.*, 2000; Houghton & Howes, 2005; Kennedy, 2009), al modificar el progreso y los síntomas de la enfermedad (Abascal & Yarnell, 2004a; Adams *et al.*, 2007). *S. lavandulifolia* demuestra por tanto efectos positivos sobre la memoria.

En ensayos clínicos controlados como el realizado por Scholey y colaboradores (Scholey *et al.*, 2008) se observan propiedades anticolinesterasa del extracto de *S.*

*lavandulifolia*. La administración de diversos extractos de la planta mejora el comportamiento y las funciones cognitivas en adultos jóvenes y sanos, así como la atención y la memoria.

La actividad sobre el sistema nervioso central de esta especie es atribuible a la presencia de metabolitos secundarios potencialmente activos, como son los compuestos fenólicos (*Panagiotopoulos et al., 2000b*) o los terpenos; que presentan actividades biológicas, algunas de ellas muy relevantes en neuroprotección (*Chang et al, 2007; Bakkali et al, 2008*). Como ya se ha demostrado, estos compuestos, que son sintetizados por la planta para protegerse de las condiciones ambientales y de los patógenos, mejoran la función cerebral (*Kennedy & Wightman, 2011*). Además, el sinergismo entre los mismos aumenta su potencia, por tanto, los compuestos minoritarios también deben ser considerados en su actividad (*Burt, 2004*).

- **Aceite esencial**

Desde hace unos años, los aceites esenciales acaparan gran interés dentro de la investigación de productos naturales con posible actividad en el tratamiento de numerosas enfermedades (*Franz, 2010*). Son diversos los estudios farmacológicos que demuestran la reputación de la Salvia española como planta aromática (*Perry & Perry, 2006*) capaz de mejorar la memoria, así como, otras actividades farmacológicas de interés de la especie, además de los compuestos químicos farmacológicamente activos y las interacciones sinérgicas y antagonistas que presentan entre ellos.

El aceite esencial obtenido de *S. lavandulifolia* ha demostrado los siguientes efectos:

- Inhibición del enzima acetilcolinesterasa (AChE).

Diversos estudios muestran que el aceite esencial de *S. lavandulifolia* presenta propiedades relevantes en la atenuación del declive cognitivo, al aumentar la

disponibilidad del neurotransmisor acetilcolina retrasando su catabolismo (Kennedy & Scholey, 2006). Esto es debido a la inhibición *in vitro* de las enzimas acetilcolinesterasa, principalmente, y butirilcolinesterasa. Se mantiene, de ese modo, la transmisión del impulso eléctrico entre las células nerviosas a receptores muscarínicos o nicotínicos. Ambas enzimas son consideradas dianas farmacológicas en diversas enfermedades asociadas a bajos niveles de ACh en cerebro (Perry *et al.*, 1996; Savelev *et al.*, 2004; Houghton *et al.*, 2006).

Esta actividad es relevante en enfermedades neurodegenerativas entre ellas la enfermedad de Alzheimer (Tildesley *et al.*, 2003), así como en la mejora de las funciones cognitivas y la pérdida de memoria asociada con la edad (Perry *et al.*, 1998).

Estudios farmacológicos, centrados en la búsqueda de compuestos bioactivos naturales procedentes de plantas aromáticas tradicionalmente utilizadas en el tratamiento de afecciones relacionadas con la demencia, profundizan en la capacidad de inhibición de la acetilcolinesterasa de *S. lavandulifolia*. Uno de los trabajos pioneros que determina esta actividad, es el realizado por Perry y colaboradores (2000a). A través de este estudio, llevado a cabo por técnicas *in vitro*, se determina la inhibición de la acetilcolinesterasa eritrocitaria humana por el aceite esencial de *S. lavandulifolia*, así como de sus terpenos aislados, mediante ensayos enzimáticos. La inhibición de la acetilcolinesterasa, se mide por una versión modificada del método colorimétrico de Ellman (Ellman *et al.*, 1961), apreciándose una inhibición dosis dependiente de la misma tanto por el aceite esencial de *S. lavandulifolia* ( $IC_{50} = 0,03 \mu\text{g/ml}$ ) como por sus componentes principales: 1,8-cineol (0,67 mM) y  $\alpha$ -pineno (0,63 mM), siendo éste último el más potente.

En este mismo estudio, el alcanfor (27% del aceite esencial) resultó menos potente ( $IC_{50} \geq 10 \text{ mM}$ ). El estudio concluye que la inhibición es reversible de forma no competitiva tanto para el aceite esencial como para los monoterpenos. De estos, el más potente es  $\alpha$ -pineno seguido del 1,8-cineol, observándose un efecto sinérgico de  $\alpha$ -

pineno, 1,8-cineol y alcanfor. Se concluye que mejorando la actividad colinérgica por la inhibición de la colinesterasa se mejora la memoria. (Perry *et al.*, 2000a).

En esta línea, estudios *in vitro* con eritrocitos bovinos también muestran que los diferentes monoterpenos constituyentes del aceite esencial (1,8-cineol, alcanfor,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, borneol, óxido de cariofileno, linalol y acetato de bornilo) presentan actividad anticolinesterasa. Los autores determinan que es el resultado de una compleja interacción entre sus componentes, por una actividad sinérgica y antagónica entre los terpenos del aceite esencial de *S. lavandulifolia*. Se observa actividad sinérgica entre 1,8-cineol y  $\alpha$ -pineno, y entre 1,8 cineol y cariofileno. Mientras, la actividad 1,8-cineol y alcanfor es antagonista en la inhibición de acetilcolinesterasa. Por tanto, el estudio concluye que la recolección de especies ricas en 1,8-cineol, pero no en alcanfor, puede proporcionar aceites con una actividad colinérgica mayor (Savelev *et al.*, 2003).

El aceite esencial de *S. lavandulifolia*, además de la actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa de eritrocitos humanos anteriormente comentada, también muestra actividad antibutirilcolinesterasa en suero humano, que es importante en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Los compuestos volátiles de los aceites esenciales de las especies de *Salvia* es probable que atraviesen la barrera sanguínea cerebral debido a su pequeño tamaño y a su lipofilia. Así se demuestra en un ensayo *in vitro* en el que la actividad anticolinesterasa disminuye con el tiempo. Esto puede presentar un potencial uso terapéutico en pacientes con demencia que se encuentren en un estado leve de la enfermedad (Savelev *et al.*, 2004)

La actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa *in vitro* del aceite esencial de *S. lavandulifolia* se ha confirmado *in vivo* a dosis altas de aceite esencial. Se ha estudiado en áreas concretas del cerebro, estriado e hipocampo, de ratas a las que se les administra oralmente 20  $\mu$ l y 50  $\mu$ l del aceite esencial durante 5 días. Los autores confirman que dicho aceite esencial resiste el proceso de digestión y atraviesa la barrera hematoencefálica del cerebro (Perry *et al.*, 2002).

Esta actividad ha sido confirmada en un ensayo clínico piloto que evalúa la tolerabilidad del aceite esencial de *S. lavandulifolia* en la terapia de la demencia, al administrar 50 µl dos veces al día durante 6 semanas por vía oral, en 11 participantes de entre 76-95 años diagnosticados de la enfermedad de Alzheimer de intensidad de leve a moderada. Produciéndose una inhibición de AChE ( $IC_{50}=0,116$  µl/ml). Cabe citar que se registra un aumento de la presión arterial de dos de los pacientes ya predispuestos a padecer hipertensión. El aceite resiste el paso gastrointestinal y las barreras sanguíneas cerebrales y produce un efecto a nivel cognitivo. Además, el sistema glutamatérgico puede estar relacionado con los efectos en el sistema nervioso central de *S. lavandulifolia* ya que los monoterpenos linalol y terpineol han demostrado presentar *in vivo* una acción depresiva sobre el sistema nervioso central. A la vista de estos resultados el aceite esencial de *S. lavandulifolia* puede ser considerado para el tratamiento de los síntomas de la enfermedad de Alzheimer (Perry et al., 2003).

Además, se han realizado dos estudios doble ciego frente a placebo con aceite esencial de *S. lavandulifolia*. La dosis más efectiva en ambos estudios es de 50 µl. Se observó una mejora en el rendimiento cognitivo y en el humor, corroborando estos resultados la capacidad de la *Salvia* como potenciadora de la memoria. La acetilcolina ejerce un papel importante en las funciones cognitivas incluidas el aprendizaje y la memoria (Tildesley et al., 2003; Tildesley et al., 2004).

#### - Antioxidante

Existen estudios sobre la actividad antioxidante de plantas de la especie *S. lavandulifolia* recolectadas en España en el estado de plena floración de la planta (Asensio et al., 2010).

Muchas enfermedades del sistema nervioso están relacionadas con el daño producido por los radicales libres debido a un exceso de estas especies reactivas de oxígeno. La actividad antioxidante del aceite de *Salvia* se relaciona con su concentración en diterpenos y sesquiterpenos oxigenados (Papageorgiou et al., 2008).



Diversos estudios químicos y farmacológicos de esta planta aromática recogidos en la literatura, la citan como fuente de antioxidantes naturales con beneficios para la salud. En los efectos positivos que el aceite esencial de *S. lavandulifolia* ejerce sobre la memoria, podrían estar implicadas otras vías de actuación, entre las que se encuentra la capacidad antioxidante ejercida tanto a través de sistemas enzimático-dependientes y enzimático independientes como la peroxidación lipídica (Zupkó *et al.*, 2001).

Algunos monoterpenos aislados del aceite esencial (1,8-cineol, linalol,  $\alpha$ - y  $\beta$ -pineno) (0,1 mM) presentan *in vitro* una potente capacidad captadora de especies reactivas debido a la inhibición significativa de la peroxidación liposomal en el cerebro bovino, en comparación con el galato de propilo (100% de inhibición a una concentración 10  $\mu$ M), determinado mediante el método *Aruoma* (1996). Mientras el geraniol y la tuyona presentan leve capacidad antioxidante (Perry *et al.*, 2001), así como el eugenol y el timol (Guillén & Manzanos, 1999).

- Antiinflamatorio.

*S. lavandulifolia* presenta una débil actividad antiinflamatoria al inhibir débil pero significativamente la síntesis de eicosanoides, como el leucotrieno [LTB<sub>4</sub>] al igual que el geraniol que presenta una débil selectividad por el tromboxano [TXB<sub>2</sub>].

En ensayos *in vitro* en leucocitos de ratas con los monoterpenos  $\alpha$ -pineno (5% de aceite esencial) y geraniol (<1% de aceite esencial), la inhibición de la ciclooxigenasa puede ser terapéuticamente relevante (Perry *et al.*, 2001; Perry *et al.*, 2003). Así mismo,  $\beta$ -cariofileno es un sesquiterpeno que ha demostrado actividad antiinflamatoria y citoprotectora gástrica *in vivo* en ratas (Tambe *et al.*, 1996).

- Estrogénica.

La actividad estrogénica presenta un papel importante en la prevención y retraso del desarrollo de la neurodegeneración, probablemente por su papel en la protección

frente a la pérdida neuronal. Tanto el aceite esencial (0,01 mg/ml) como su monoterpeno geraniol (0,1-2 mM), presentan una moderada actividad estrogénica *in vitro* mediante la inducción de la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa en cultivos de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) (Perry *et al.*, 2001).

El conjunto de las actividades inhibidora de la acetilcolinestera, antioxidante, antiinflamatoria y estrogénica pueden tener un efecto positivo en el sistema nervioso central y por tanto, en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, debido, como ya se ha adelantado, a complejas interacciones entre los terpenos que forman parte del aceite esencial. Por ejemplo, existe una actividad sinérgica entre 1,8-cineol y  $\alpha$ -pineno u óxido de cariofileno y una actividad antagonista con el alcanfor (efectos prooxidantes).

En la **Tabla 5** se recogen estudios llevados a cabo tanto *in vitro* como en *in vivo*, así como ensayos clínicos de la actividad de *S. lavandulifolia*.

### **Otras actividades**

Además de su indudable interés en las funciones cognitivas, el aceite esencial también posee otras actividades como por ejemplo:

#### **- Espasmolítica**

Existen estudios que relacionan la actividad espasmolítica y la composición del aceite esencial de subespecie *oxyodon*, en diferentes estadios de recolección. Se observa en las muestras de aceite esencial la capacidad de inhibir la acetilcolina, inductora de las contracciones, en el duodeno de ratas Wistar macho. La máxima actividad espasmolítica la presentan las muestras recolectadas durante el mes de Mayo ( $ED_{50}=14.0\pm 2,5$   $\mu$ g/ml) caracterizado por una mayor presencia de borneol (16%) y la mínima actividad en Julio ( $ED_{50}=62,9\pm 4,4$   $\mu$ g/ml), detectando sólo trazas de borneol

(<0,5%). Aunque la actividad espasmolítica del aceite esencial no puede ser atribuida al comportamiento de un único componente, si no a una acción simultánea de varios. A la vista de estos resultados, el mes de Mayo puede ser considerado el periodo ideal de recolección, aunque los niveles altos de 1,8-cineol y alcanfor durante otros meses justifica su recolección también fuera del periodo de floración (Crespo *et al.*, 1986).

- Depresora del Sistema Nervioso Central

Los monoterpenos linalol y terpineol han mostrado actividad ansiolítica *in vivo*, estando implicado el sistema glutamatérgico (Perry *et al.*, 2003).

- Antifúngica

Comprobada en estudios sobre *Candida albicans*, *S. lavandulifolia* posee una fuerte actividad antifúngica *in vitro* comparada con otras especies de *Salvia*. Probablemente sus principales componente (1,8-cineol y alcanfor) influyen en su actividad antifúngica (Jirovetz *et al.*, 2007).

- Antimicrobiana

Esta actividad ha sido reconocida desde hace tiempo. El aceite esencial de *S. lavandulifolia* se usa como control en el crecimiento y la supervivencia de microorganismos patógenos mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC). Entre los más estudiados por técnicas *in vitro*, sobre cultivos se encuentra *Listeria monocytogenes* demostrando la inhibición de crecimiento producida (Rota *et al.*, 2004). Se observa sinergismo entre el carvacrol y el *p*-cimeno, su precursor, y entre el cinamaldehído y el eugenol. Existen evidencias de que los componentes minoritarios presentan un papel importante en esta actividad, posiblemente debido al sinergismo que presentan entre ellos (Burt, 2004). Los organismos Gram-positivos en general son más sensibles al aceite esencial que los Gram-negativos. Estas propiedades antimicrobianas se atribuyen principalmente a la presencia de 1,8-cineol,  $\beta$ -tuyona, alcanfor, borneol y *p*-cimeno (Pierozan *et al.*, 2009).

- Citotóxica

En algunos estudios *in vitro* se compara el efecto citotóxico del aceite esencial sobre diferentes células tumorales humanas, por ejemplo, procedentes de adenocarcinoma de pulmón o de ovario, así como de pacientes con leucemia, en comparación con la doxorubicina, agente anticancerígeno empleado como control. Se ha comprobado, que el aceite esencial de *S. lavandulifolia* posee una leve actividad citotóxica, si bien es menos activo que la doxorubicina, en cultivos de diferentes líneas celulares de tumores humanos (Foray et al., 1999).

Esta actividad citotóxica se relaciona con la actividad prooxidante de algunos componentes del aceite esencial, ya que el daño a la pared celular y a la membrana, provocado conduce a una lisis a nivel celular, así como una reducción del tamaño del tumor y su proliferación. El geraniol, por ejemplo, inhibe la proliferación de las células de cáncer de colon mediante la despolarización de la membrana y las vías de señalización de los canales iónicos (Foray et al., 1999; Bakkali et al., 2008).

La actividad de los componentes identificados en el aceite esencial de *S. lavandulifolia* se resume en la **Tabla 6**.

## 2.9. TOXICIDAD Y EFECTOS ADVERSOS

Tanto *S. lavandulifolia*, como sus extractos acuosos e hidroalcohólicos, presentan muy baja toxicidad, aunque el aceite esencial sí parece originar cierta neurotoxicidad debido a la presencia de tuyonas y en menor medida al alcanfor, pudiendo causar convulsiones. Esta especie de *Salvia* ha sido ampliamente utilizada desde hace mucho tiempo como saborizante de los alimentos, no habiéndose observado efectos adversos informados por su consumo (Perry et al., 2001); podemos concluir que no se considera tóxica, salvo que se use a muy elevadas concentraciones.

En relación con la posible toxicidad de alguno de los componentes del aceite esencial se han realizado diversos estudios:

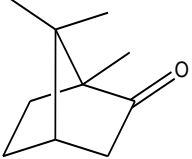
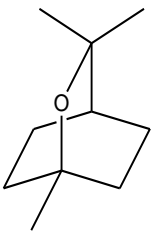
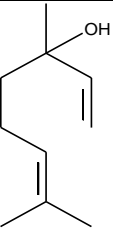
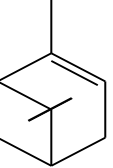
- **Acetato de sabinilo** (0,1-24% según la subespecie, el quimiotipo y el origen) es un terpeno susceptible de atravesar la barrera placentaria y presentar una potencial teratogenicidad, efectos abortivos dosis-dependientes *in vivo* en ratones, así como hepatotoxicidad. Por estos motivos debe ser evitado en mujeres embarazadas (*Pages et al., 1992; Fournier et al., 1993*). La proporción más importante de este compuesto procede de la subsp. *vellerea* (*Marcos et al., 1988*).
- **Alcanfor** (15-36%) ocasiona problemas gastrointestinales como náuseas o vómitos; a dosis elevadas produce convulsiones, estado epiléptico, así como daños renales y hepatotoxicidad tras la ingesta, y neurotoxicidad tras la aplicación tópica (*Millet et al., 1981; Grbic et al., 2008; Schnitzler et al., 2008*).
- **Tuyonas** ( $\alpha$ -tuyona y  $\beta$ -tuyona) son monoterpenos potencialmente tóxicos por ser antagonistas de receptores GABA neuronales (*Johnston & Beart, 2004; Kennedy & Wightman, 2011*). Es responsable de crisis convulsivas y epilépticas, siendo tóxica a elevadas concentraciones. Su presencia en *S. lavandulifolia* es poco significativa (<0,5%) (*Bruneton, 2001; Baricevic & Bartol, 2000*) y por tanto menos tóxica que en otras especies del mismo género, como por ejemplo en *S. officinalis*, donde la concentración de tuyonas es elevada (1,20-45,80%  $\alpha$ -tuyona y 1,02-40,10 %  $\beta$ -tuyona), siendo a altas concentraciones tóxica (*Tildesley et al., 2003; Abascal et al., 2004b*). Presenta genotoxicidad, neurotoxicidad y se ha comprobado que es carcinógena en ensayos realizados en ratas y ratones (*Höld et al., 2001*). Por tanto, *S. lavandulifolia* es una especie más interesante a la hora de estudiar sus utilidades como planta terapéutica que *S. officinalis* (*Giannouli & Kintzios, 2000; Perry et al., 2000a*).

**Tabla 5. Estudios farmacológicos del aceite esencial de *Salvia lavandulifolia***

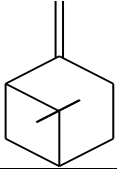
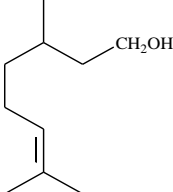
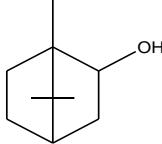
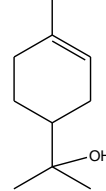
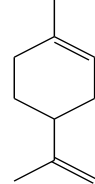
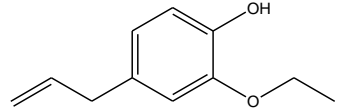
Tipo de ensayo	Ref.	Características del ensayo	Parte de la planta usada	Objetivo	Resultados
<i>in vitro</i>	<b>Perry et al., 1996</b>	Tejido cerebral humano ( <i>post-mortem</i> ). Método de Ellman	Aceite esencial <i>S.lavandulifolia</i>	Análisis de la actividad inhibitoria de AChE de forma dosis-dependiente.	Efectos inhibidores en el cerebro de AChE e interacciones con el receptor nicotínico y muscarínico.
	<b>Perry et al., 2000a</b>	Eritrocitos humanos. Método Ellman	Aceite esencial y terpenos de <i>S.lavandulifolia</i>	Inhibición dosis-dependiente de la acetilcolinesterasa eritrocitaria humana.	Inhibición de AChE por el aceite esencial. 1,8-cineol, $\alpha$ -pineno y alcanfor. Relación sinérgica entre los componentes del aceite esencial.
	<b>Perry et al., 2001</b>	Cerebro bovino Ensayo de antioxidantes, estrogénica	Aceite esencial y terpenos aislados de <i>S.lavandulifolia</i>	Peroxidación lipídica en tejido cerebral bovino, y unión a los receptores de estradiol en levadura.	Antioxidante y captadora de radicales libres, reducción de la peroxidación ( $\alpha$ y $\beta$ pineno, geraniol, 1,8-cineol y tuyona). Alcanfor pro-oxidante. Débil actividad estrogénica del aceite esencial y geraniol.
	<b>Savelev et al., 2003</b>	AChE de eritrocitos bovinos. Método Ellman	Aceite esencial <i>S.lavandulifolia</i>	Terpenos (1,8-cineol, alcanfor, $\alpha$ -pineno, $\beta$ -pineno, borneol, óxido de cariofileno, linalol, acetato de decatrieno), actividad inhibitoria AChE.	Interacciones sinérgicas y antagónicas entre los terpenos. Mezclas de terpenos menos potentes que aceite esencial completo. 1,8-cineol el más potente ( $IC_{50} = 0,06$ mg/ml).
	<b>Savelev et al., 2004</b>	AChE de eritrocitos humanos Método Ellman	Aceite esencial <i>S.lavandulifolia</i>	Inhibición dosis dependiente de BuChE y AChE	Inhibición de la AChE eritrocitaria humano (por $\beta$ -cariofileno; 3-careno; 1, 8-cineol; $\alpha$ -pineno y $\beta$ -pineno) dependiente de la dosis de aceite esencial. Actividad anti-butilcolinesterasa.
<i>in vivo</i>	<b>Perry et al., 2002</b>	Estriado e hipocampo ratas. Actividad de AChE	Aceite esencial <i>S.lavandulifolia</i>	Capacidad de inhibición de AChE en ratas.	Disminución AChE dosis-dependiente. Componentes del aceite resisten la digestión y atraviesan la barrera hematoencefálica.

Ensayo clínico	<b>Perry et al., 2003</b>	Pacientes con probable Alzheimer (intensidad leve a moderada)	Aceite esencial <i>S.lavandulifolia</i>	Tolerancia de la administración oral de aceite esencial en pacientes con enfermedad de Alzheimer.	Mejoras en la memoria y la atención. Dos pacientes con hipertensión tuvieron aumento en la tensión sanguínea a la dosis mayor.
	<b>Tildesley et al., 2003</b>	Estudio doble ciego, controlados con placebo, aleatorizados. Jóvenes voluntarios sanos	Aceite esencial <i>S.lavandulifolia</i>	Mejorar la memoria, cognición y efectos del estado de ánimo con inhibición de AChE.	Inhibición de la AChE ( $IC_{50}=0,07$ mg/ml). Mejoras significativas en la recuperación inmediata y retardada de la palabra.
	<b>Tildesley et al., 2005</b>	Estudios doble ciego, controlados con placebo, aleatorios. Adultos jóvenes sanos	Aceite esencial <i>S.lavandulifolia</i>	Mejora de la memoria y el estado de ánimo. Efectos con propiedades de inhibición de la AChE.	Mejorar del rendimiento cognitivo y precisión de la memoria.
	<b>Kennedy et al., 2010</b>	Estudio doble ciego, controlado con placebo. Adultos jóvenes	Aceite esencial <i>S.lavandulifolia</i>	Efectos sobre el rendimiento cognitivo y el estado de ánimo.	Aceite esencial con altos niveles de 1,8-cineol inhibe AChE. Mejora rendimiento, atención y memoria. Reduce la fatiga mental y aumenta la lucidez subjetiva.
	<b>Moss et al., 2010</b>	Adultos sanos	Aroma de aceite esencial <i>S.lavandulifolia</i>	Efecto de aromas en la cognición y la memoria.	Ningún efecto significativo del aroma en alguno de los factores de rendimiento cognitivo. Pequeños aumentos en alerta.
	<b>Thackeray et al., 2010</b>	Estudio doble ciego, controlado con placebo, aleatorio. Voluntarios sanos	Aceite esencial <i>S.lavandulifolia</i>	Sensibilidad cognitiva y medidas del estado de ánimo.	Reducción fatiga mental subjetiva. Mejora alerta, velocidad reacción y memoria retardada. Efectos sobre cognición.

**Tabla 6. Principales monoterpenos presentes en el aceite esencial de *S.lavandulifolia* y su actividad farmacológica.**

Compuesto	Estructura Química	Actividad		Referencia	
<b>Alcanfor</b>		antagonista antimicrobiana antiChE antiespasmódica	hepatotóxica neurotóxica pro-oxidante	<i>Jiménez et al., 1983</i> <i>Perry et al., 2001</i> <i>Savelev et al., 2003</i>	<i>Perry et al., 2000</i> <i>Barcevic &amp; Bartol, 2000</i> <i>Park et al., 2001</i> <i>Cardile et al., 2009</i>
<b>1,8-cineol (eucaliptol)</b>		analgésica antiChE antifúngica antiinflamatoria antimicrobiana antioxidante apoptosis inductora	caspara activadora gastroprotectora hepatoprotectora locomotora neuroprotectora mutagénesis supresora	<i>Ilmberger et al., 2001</i> <i>Perry et al., 2003</i> <i>Savelev et al., 2003</i> <i>Juergens et al., 2004</i> <i>Santos et al., 2004</i> <i>Savelev et al., 2004</i> <i>Santos et al., 2004</i>	<i>Chang et al., 2007</i> <i>Edris, 2007</i> <i>Cardile et al., 2009</i> <i>Hendry et al., 2009</i> <i>Mitic-Culafic et al., 2009</i> <i>Vilela et al., 2009</i> <i>Cha et al., 2010</i>
<b>linalol</b>		antiChE débil antiinflamatoria antioxidante antimicrobiana antimutagénica	antitumoral antiviral colerética sedantes en SNC	<i>Barcevic &amp; Bartol, 2000</i> <i>Perry et al., 2000</i> <i>Re et al., 2000</i> <i>Ilmberger et al., 2001</i> <i>Perry et al., 2003</i>	<i>Peana et al., 2006</i> <i>Mitic-Culafic et al., 2009</i> <i>Belletti et al., 2010</i> <i>Gu et al., 2010</i>
<b>α-pineno</b>		antiChE fuerte antiinflamatoria antioxidante	antiviral inhibidora de cicloxigenasa neuroprotectora	<i>Perry et al., 2000</i> <i>Perry et al., 2001</i> <i>Perry et al., 2003</i> <i>Savelev et al., 2004</i>	<i>Miyazawa &amp; Yamafuji, 2005</i> <i>Chang et al., 2007</i> <i>Astani et al., 2009</i>



<b>β-pineno</b>		anti-BuChE antiChE antimicrobiana	antioxidante neuroprotectora	<i>Perry et al., 2003</i> <i>Savelev et al., 2004</i> <i>Chang et al., 2007</i> <i>Belletti et al., 2010</i>
<b>geraniol</b>		antibacteriana antiChE antiinflamatoria antioxidante	estrogénica insecticida quimoprotectora repelente	<i>Perry et al., 2001</i> <i>Carnesecchi et al., 2001</i> <i>Burt, 2004</i> <i>Bakkali et al., 2008</i> <i>Chen &amp; Viljoen, 2010</i>
<b>borneol</b>		antiChE espasmolítica neuroprotectora		<i>Barcevic &amp; Bartol, 2000</i> <i>Perry et al., 2001</i> <i>Chang et al., 2007</i>
<b>α-terpineol</b>		antiChE débil antibacteriana antiviral	colerética depresiva SNC neuroprotectora	<i>Barcevic &amp; Bartol, 2000</i> <i>Perry et al., 2003</i> <i>Burt, 2004</i> <i>Chang et al., 2007</i> <i>Astani et al., 2009</i> <i>Cardile et al., 2009</i>
<b>limoneno</b>		antitumoral quimioprotectora		<i>Crowell, 1999</i>
<b>eugenol</b>		antibacteriana antiinflamatoria antioxidante	insecticida fotocitotóxica, pro-oxidante	<i>Burt, 2004</i> <i>Yoo et al., 2005</i> <i>Kabuto et al., 2007</i>

# **MATERIAL Y MÉTODOS**



# 1. MATERIAL

## 1.1. MATERIAL VEGETAL

### 1.1.1. *Salvia lavandulifolia* Vahl

El material vegetal utilizado en este trabajo de Tesis Doctoral es la especie *Salvia lavandulifolia* Vahl. procedente de diferentes cultivos de la Península Ibérica, localizados en Aranjuez (Madrid) y Solsona (Lérida) habiéndose empleado para este estudio la parte aérea, recolectada manualmente. La recolección se llevó a cabo entre los años 2008 y 2010.

Los ejemplares fueron autenticados taxonómicamente por la Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Cases Capdevila (Departamento de Plantas Aromáticas y Medicinales. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria –INIA-, Ministerio de Ciencia e Innovación). Los ejemplares de *Salvia lavandulifolia* en estudio (**Figura 13**), corresponden a:

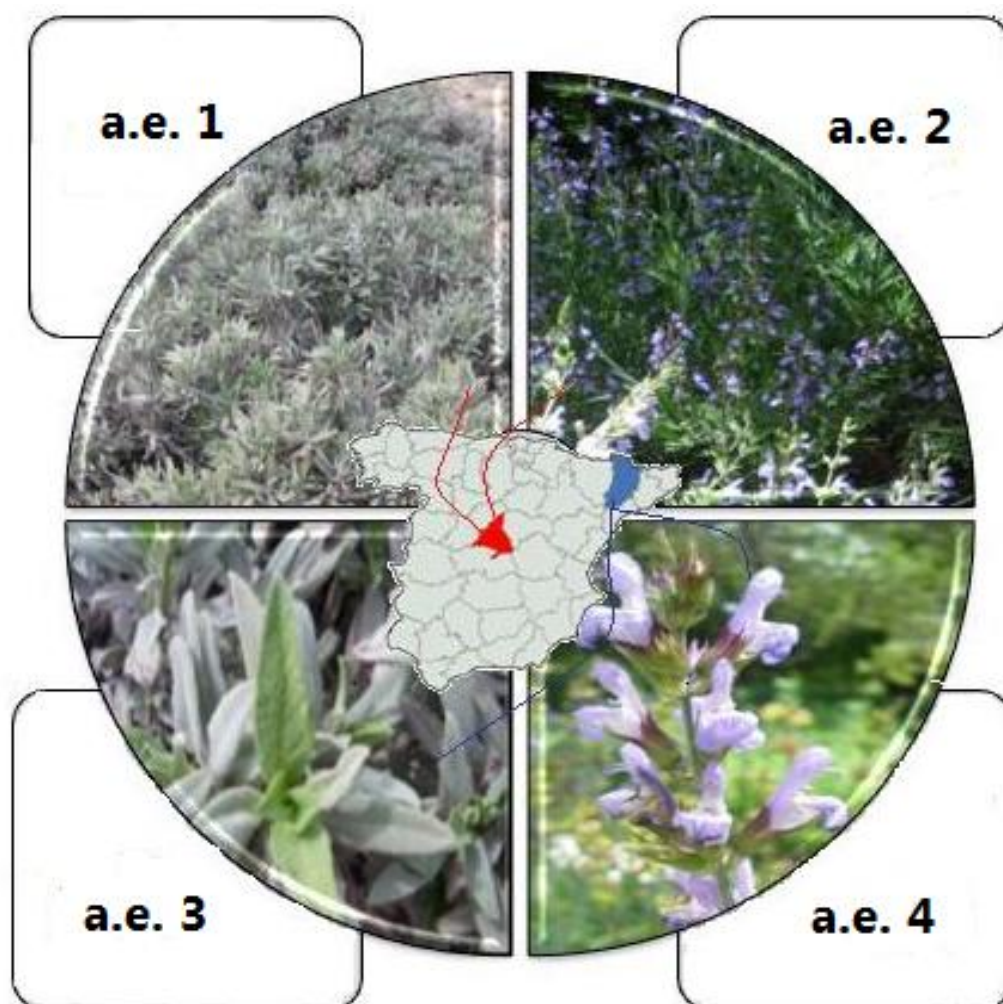
1. *S. lavandulifolia* recolectada en diferente estado fenológico

Se recolectan las plantas en el *Centro de ensayo de evaluación de variedades* de Aranjuez (Comunidad de Madrid) del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Ministerio de Ciencia e Innovación. Estas muestras proceden del mismo cultivo y se recolectan antes de la floración (marzo 2010) la muestra denominada **a.e. 1** y en plena la floración (junio 2010) la muestra denominada **a.e. 2**.

2. *S. lavandulifolia* cultivada con diferente densidad de plantación

Se recolectan plantas cultivadas en Solsona (Lérida), procedentes de un ensayo en el que se evalúa la influencia de la densidad de plantación. Las

muestras corresponden a un cultivo con una distancia de 0,6 m entre plantas y una distancia entre líneas de 0,8 m en la muestra denominada **a.e. 3** y de 1,2 m en la muestra denominada **a.e. 4**.



**Figura 13.** *Salvia lavandulifolia* Vahl. **a.e. 1** y **a.e. 2** especies recolectadas en Aran juez (Madrid) y **a.e. 3** y **a.e. 4** especies recolectas en Solsona (Lérida).

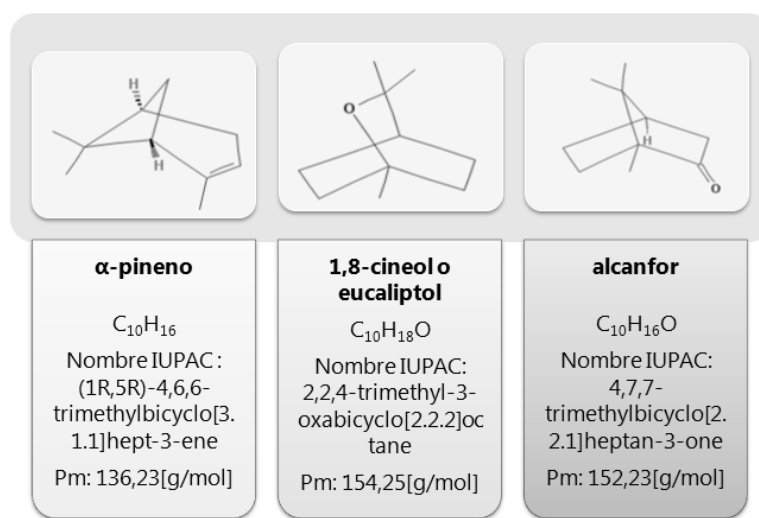
Las partes aéreas fueron convenientemente extendidas para su desecación a temperatura ambiente y posteriormente se guardaron en lugar fresco y seco hasta el momento de la destilación, preservadas de la luz.

- **Aceite esencial de *Salvia lavandulifolia***

El aceite esencial de *Salvia lavandulifolia* se obtiene de las partes aéreas recolectadas, mediante hidrodestilación, tal y como se explica en el apartado de *Métodos* (2.1.1.).

- **Monoterpenos**

Además del aceite esencial de *Salvia*, se ha determinado el efecto antioxidante y protector de algunos de sus componentes, concretamente de los monoterpenos **1,8-cineol**, **alcanfor** (*International Flavours & Fragrances IFF*, España) y  **$\alpha$ -pineno** (*Sigma-Aldrich*, España).



**Figura 14.** Estructura química y características de los monoterpenos mayoritarios en las muestras en estudio de aceite esencial de *Salvia lavandulifolia*.

#### - Preparación de las muestras

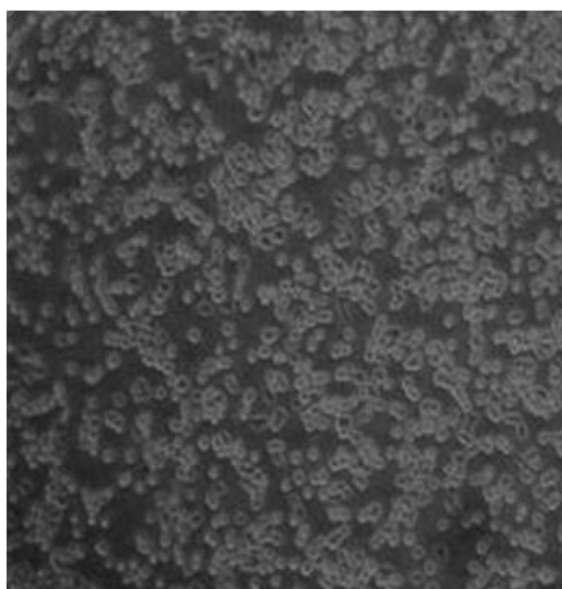
Para los estudios de estrés oxidativo, tanto los aceites esenciales como los monoterpenos se disuelven en dimetilsulfóxido [ $C_2H_6OS$ ] (DMSO) (*Panreac Química*, España). A continuación, se realizan diluciones sucesivas en tampón fosfato salino (PBS) (*Gibco*, *Invitrogen Corporation*, UK). La concentración final de DMSO es menor al 1%, porcentaje este que no afecta al crecimiento normal de las células.

Se ensayan un amplio rango de concentraciones con la finalidad de establecer las más adecuadas para llevar a cabo los estudios de estrés oxidativo posteriores. Se seleccionan las concentraciones más eficaces y que a su vez no afecta al desarrollo de los cultivos celulares. Estas concentraciones son 75, 50, 25, 15 y 5  $\mu\text{g/ml}$  para cada aceite esencial y 400, 300, 250, 100, 50, 25 y 10  $\mu\text{M}$  para cada monoterpeno.

## 1.2. LÍNEAS CELULARES

### 1.2.1. PC12 (neuronas)

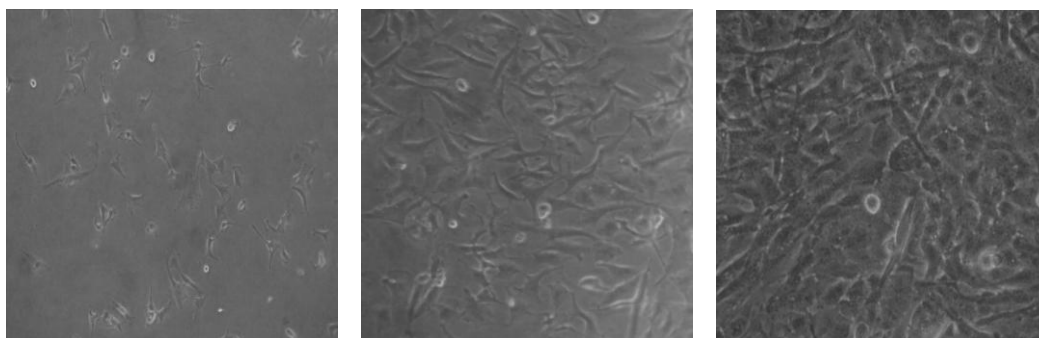
Se utiliza la línea celular PC12 (*American Type Culture Collection, ATCC, USA*) (**Figura 15**), derivada de feocromocitoma de rata (*Rattus norvegicus*), un tipo de tumor derivado de las glándulas suprarrenales (*Greene & Tischler, 1976*). Las líneas celulares que expresan propiedades neuronales son muy útiles como modelo para el estudio del sistema nervioso a nivel celular y molecular, y se utilizan habitualmente en el estudio del desarrollo y la función neuronal. Estas células en cultivo adoptan una morfología redondeada con baja capacidad de adherencia, tendiendo a crecer en agrupaciones.



**Figura 15. Neuronas (Línea celular PC12) en cultivo**, en las condiciones indicas en el texto.

### 1.2.2. U373-MG (astrocitos)

La línea celular U373-MG ECACC (*European Collection of Animal Cell Cultures*, Salisbury, Wiltshire, UK) (**Figura 16**) proviene de astrocitoma-glioblastoma cerebral humano (*Chen & Swanson, 2003*). Son células que crecen en monocapa adheridas fácilmente a la superficie de cultivo, presentando morfología estrellada.



**Figura 16.** Astrocitos (línea celular U373-MG) en cultivo durante diferentes etapas de crecimiento.

### 1.3. INDUCTOR DE ESTRÉS OXIDATIVO: $H_2O_2$

El tóxico seleccionado para favorecer la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), es el peróxido de hidrógeno [ $H_2O_2$ ] (*Sigma-Aldrich, España*), siendo el radical hidroxilo que se forma el responsable de los efectos citotóxicos.

El peróxido de hidrógeno origina radicales libres por la reacción de Haber-Weiss ( $O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightleftharpoons O_2 + \cdot OH + OH^-$ ). Se produce un incremento del estrés oxidativo, que a su vez produce un incremento en la formación de radicales libres. Estos últimos juegan un papel importante en la degeneración y muerte neuronal en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas (*Halliwell, 1992*).



Para inducir el estrés oxidativo sobre la línea celular PC12 se utiliza una concentración de tóxico de 0,1 mM. Mientras que para la línea celular U373-MG, la concentración utilizada es de 1 mM. Dichas concentraciones fueron establecidas por el equipo de investigación en trabajos previos. Estas concentraciones ocasionan el 50% de la mortalidad ( $IC_{50}$ ) (Naval, 2006; Martín, 2009). Además, como control negativo se utiliza Tritón X-100.

## 1.4. MATERIAL DE LABORATORIO

Durante el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral se utilizan los siguientes equipos de laboratorio:

- Agitador asimétrico orbital-balance "3D" (Boeco, Alemania)
- Agitador magnético con calefacción, Modelo ARE (VELP Scientifica, Italia)
- Agitador orbital "GFL 3005" (Burgwedel, Alemania)
- Balanza Modelo KERN EMB 500-1, sensibilidad  $\pm 0,1$  g (Balingen-Frommern, Alemania)
- Balanza de precisión: Modelo AJ100, sensibilidad  $\pm 0,0001$  g (Mettler, Suiza)
- Baño de agua termostatzado con agitación, Modelo UNITRONIC 320 OR, (Selecta Precistern, España)
- Cámara digital, Moticom 2500 (MOTIC, China)
- Centrífuga Sorvall RC-5B. Refrigerated Superspeed Centrifuge (Du Pont Instrument, España)
- Cromatógrafo de gases, Hewlett Packard 6890 (Hewlett Packard, USA)
- Espectrofotómetro UV-Vis UVIKON 930 (Kontron Instruments, Italia)
- Fluorímetro lector de microplacas FLx800, (Biotek Instruments, Inc, Vermont, EEUU)
- Fluorímetro lector de microplacas FLUOstar Optima, (BMG Labtech, Alemania)
- Homogenizador Ultra Turrax T45, IkaWerk, Modelo Janke-Kunkel, (IKA Biotechnik, Alemania)

- Lector de placas Digiscan 340 Asys HITECH. (GMBH, Alemania)
- Máquina de hielo triturado, Scotsman AF-80 (Scotsman, Italia)
- pH Meter Basic 20 (Crison Instruments, España)
- Pipetas:
  - BioPette Autoclavable. (Labnet, USA)
    - 100-1000 µl (monocanal)
    - 10-100 µl (monocanal)
    - 5-50 µl (multicanal)
  - BOECO (BOECO, Alemania)
    - 0,5-10 µl (monocanal)
    - 50-300 µl (multicanal)
- Pipeta serológica (Sarsdtedt, Alemania)
- Placa cc 100/20 Placa 96 por cc (Sarsdtedt, Alemania)
- Sonicador Ultrasonic Processor Modelo UP50H, Dr. Hielscher (GMBH, Alemania)
- Tubos estériles 15 y 50 ml (Sarsdtedt, Alemania)
- Vortex: Bunsen. (Nessler, España)

- **Material para el cultivo celular**

Los cultivos celulares se deben realizar en condiciones de esterilidad en un lugar específico para cultivos. El material empleado en este trabajo es el siguiente:

- Autoclave, Trace Raypa Steam Sterilizer, Modelo STERICLAV-S (Raypa, España)
- Baño termostatzado, Modelo Unitronic 320 OR (Selecta Precistern, España)
- Cabina de flujo laminar vertical, Thermo Scientific. (MSC Advantage, España)
- Centrífuga Sorvall RT 6000 Du Pont Instruments (Giralt, EEUU)

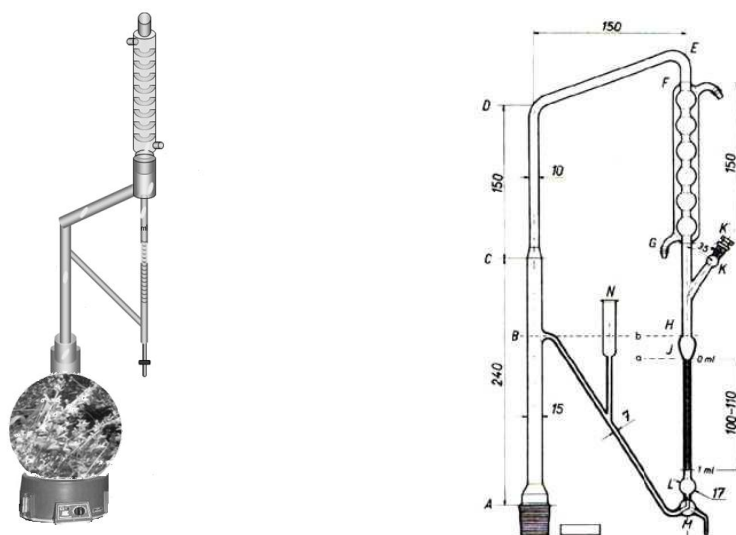
- Congelador de -80°C, Modelo 902, Thermo electron corporation. (ULT Freezer, España)
- Eppendorf de 0,5; 1,5 y 2 ml (Sarsdtedt, Alemania)
- Frigorífico y congelador -20°C (Balay, España)
- Incubador termostatzado con gas CO<sub>2</sub>, Modelo Heracell 150 (Thermo Electron Corporation, España)
- Microscopio óptico invertido (NIKON TMS, Japón)
- Nitrógeno Líquido, 35 VHC (Taylor-Wharton, Alemania)
- Pipetas estériles (Sarsdtedt, Alemania)
- Frascos de cultivo estériles (Sarsdtedt, Alemania)
- Placas petri y placas de 96 pocillos estériles (Sarsdtedt, Alemania)
- Tubos estériles de 15 y 50 ml (Sarsdtedt, Alemania)

## 2. MÉTODOS

### 2.1. ESTUDIO FITOQUÍMICO

#### 2.1.1.Extracción del aceite esencial por hidrodestilación

Las partes aéreas de *Salvia lavandulifolia*, una vez desecadas, se someten a extracción por **destilación por arrastre en corriente de vapor de agua**, para obtener el aceite esencial (*Real Farmacopea Española*, 2002). Para ello se emplea una bureta tipo Clevenger (*Figura 17*).



**Figura 17.** Bureta tipo Clevenger usada para la obtención del aceite esencial y aparato para la determinación de aceites esenciales en las drogas vegetales (*Real Farmacopea Española*, 2ª ed., 2002).

La técnica se basa en la propiedad de los aceites esenciales de ser volátiles y arrastrables fácilmente en corriente de vapor de agua. Una vez finalizado el proceso, el aceite esencial obtenido se deseca con sulfato sódico anhidro para eliminar los restos de agua. Las muestras se conservan adecuadamente etiquetadas en nevera a 4°C, protegidos de la luz y del calor.

## 2.1.2. Determinación de la composición química por cromatografía de gases (CG)

### ▪ Fundamento

Los aceites esenciales extraídos previamente, se analizan por cromatografía de gases para separar e identificar sus componentes (*Masada, 1976*). Para ello, se emplea: cromatógrafo Hewlett Packard modelo 6890 (**Figura 18**) provisto de un detector de ionización de llama (FID) y equipado con una columna capilar de 30 m de longitud y 0,320 mm de diámetro.



**Figura 18.** Cromatógrafo de gases modelo Hewlett Packard 6890.

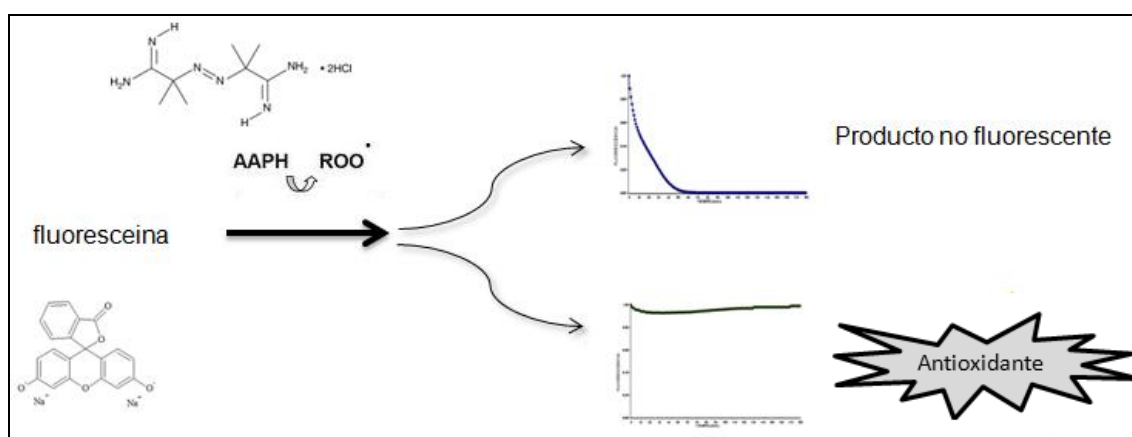
En la cromatografía de gases, los aceites esenciales analizados se evaporan y son arrastrados por la fase móvil a través de una columna capilar. Los compuestos se separan según la afinidad por la fase estacionaria, así como, según su presión de vapor relativa. Al final de la columna capilar los compuestos se encuentran separados y se detectan individualmente según su tiempo de retención.

## 2.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA

### 2.2.1. Determinación de la actividad antioxidante: ensayo de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC)

#### ▪ Fundamento

Este método determina la capacidad antioxidante de la muestra problema frente al daño oxidativo producido por los radicales peroxilos (usados como pro-oxidantes). Mediante este ensayo (Cao *et al.*, 1993) se mide la pérdida de fluorescencia de la fluoresceína en presencia de radicales peroxilo generados por la descomposición térmica del 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH) (Ou *et al.*, 2001) según el método descrito por Dávalos (Dávalos *et al.*, 2004) (**Figura 19**).



**Figura 19. Capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC).** Pérdida de fluorescencia en presencia de ROS y mantenimiento de la fluorescencia en presencia de antioxidantes.

#### ▪ Reactivos

- 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH) (Sigma-Aldrich, España)
- Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox) (Sigma-Aldrich, España)

- Fluoresceína (*Sigma-Aldrich, España*)
- Metanol (*Panreac Química, España*)
- Tampón PBS [ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  +  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ] (*Panreac Química, España*)

▪ **Método**

Las muestras de aceite esencial o los monoterpenos en estudio se disuelven en metanol (1 mg/ml) y a partir de dicha solución, se preparan diluciones en PBS (75 mM; pH 7,4). El antioxidante usado como referencia es el Trolox, análogo sintético hidrosoluble de la vitamina E. En una placa de 96 pocillos se añaden las muestras objeto de estudio, así como el Trolox y la fluoresceína (120  $\mu\text{l}$ , 70 nM) y se atempera a 37°C, durante 10 minutos.

A continuación, se añade el AAPH (60  $\mu\text{l}$ , 12 mM), como iniciador de la formación de radicales libres. La temperatura es de 37°C (*Huang et al., 2002*). La fluorescencia se mide en un lector de microplacas OPTIMA FLUOstar fluorimétrico (BMG LABTECH GmbH, Alemania) a una longitud de onda  $\lambda_{\text{exc}} = 485 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ . Se registra cada 90 segundos durante 2 horas y media en un total de 104 ciclos. El lector de microplacas de fluorescencia se controla por Software FLUOstar (V2.20 R7).

La pérdida de la fluorescencia a lo largo del tiempo se cuantifica mediante la fórmula que determina el área bajo la curva (AUC):

$$\text{AUC} = 1 + \sum f_i / f_0$$

Donde,

$f_0$ : es la fluorescencia inicial medida a tiempo 0.

$f_i$ : es la fluorescencia medida a un tiempo determinado.

A continuación, se determina el área bajo la curva neta (AUC) para cada muestra:

$$\text{AUC total} = \text{AUC antioxidante (Trolox o muestra)} - \text{AUC del blanco}$$

De este modo se calculan las ecuaciones de la recta de regresión correspondientes al área neta y a la concentración del antioxidante en estudio. Los resultados se expresan en  $\mu$ moles equivalentes de Trolox / mg de muestra en estudio. Siendo la concentración de antioxidante de las muestras proporcional a la intensidad de la fluorescencia en el ensayo (Ou et al., 2002; Tomer et al., 2007).

## **2.2.2. Cultivos celulares**

### **2.2.2.1. MANTENIMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES**

- **Línea celular PC12**

El medio de cultivo utilizado para el correcto crecimiento de la línea celular es *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) con 4,5 g/L de glucosa, L-glutamina, 25 mM de HEPES y sin piruvato (*Gibco, Invitrogen, UK*) suplementado con 10% de suero de caballo (HS) (*Gibco, Invitrogen, UK*) y 5% de suero fetal bovino (FBS) (*Gibco, Invitrogen, UK*) para favorecer la proliferación celular. Se emplean frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (*Sarstedt, Alemania*). Para mantener el crecimiento del cultivo se usa medio con HS al 1%. Ambos medios se complementan con 0,5% de gentamicina (*Gibco, Invitrogen, UK*) y 0,2% de ácido pirúvico (*Gibco, Invitrogen, UK*). Las células se mantienen en el incubador a 37°C y en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y aire al 95%. Para favorecer la adherencia de las células las placas se recubren durante 2 horas con polilisina L (10 mg/ml) (*Sigma-Aldrich, España*).

- **Línea celular U373-MG**

El medio de cultivo utilizado para el correcto desarrollo de esta línea celular está compuesto por *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) con 4,5 g/l de glucosa, L-glutamina, 25 mM de HEPES y sin piruvato (*Gibco, Invitrogen, UK*); con el antibiótico gentamicina al 0,5% (*Gibco, Invitrogen, UK*), suero fetal bovino (FBS) (*Gibco, Invitrogen, UK*) al 10% o al 1% para el crecimiento o mantenimiento del cultivo, respectivamente.



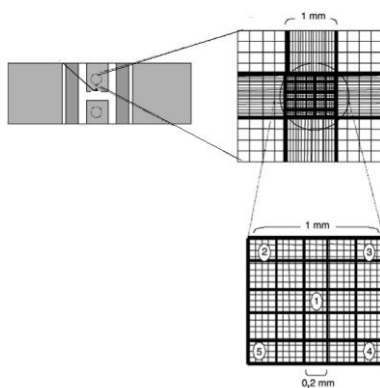
Se emplean frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (*Sarstedt, Alemania*). Las células se mantienen en incubador a 37°C y en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y de aire al 95%.

#### 2.2.2.2. SUBCULTIVOS CELULARES

Cuando las células alcanzan confluencia, el subcultivo celular es necesario para que las células continúen creciendo en condiciones óptimas. Para ello, añade PBS sin calcio y sin magnesio para eliminar los restos de medio de cultivo y se adiciona Tripsina-EDTA (*Gibco, Invitrogen, UK*), para romper la unión de las células adheridas al sustrato. Se incuban durante 2-3 minutos a 37°C y una saturación de CO<sub>2</sub> al 5%. A continuación, se añaden 10 ml de medio de cultivo correspondiente a cada línea celular, ya que la tripsina se neutraliza con los cationes Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>. En el caso de la línea U373-MG, posteriormente las células se centrifugan a 800 rpm durante 5 minutos, a continuación se elimina el sobrenadante y se añaden 10 ml de medio.

##### ▪ Recuento celular

Para cuantificar el número de células viables se empleó el método de exclusión con azul tripán [Tripán Blue, solución 0,4%] (*Sigma-Aldrich, España*) en cámara de Neubauer (*Keith & Elliot, 1979*) (**Figura 20**). El azul tripán es un colorante que se introduce en el interior de las células que presentan la membrana rota, tiñendo de forma selectiva las células muertas.



**Figura 20. Cámara de Neubauer.** Distribución de los cuadrantes que la componen.

La conversión del número de células/cámara en células/ml se lleva a cabo empleando el siguiente factor, que tiene en cuenta el volumen de la cámara.

$$\text{Nº de células totales} = \frac{[\text{nº células viables} \times 10^4 \times \text{Factor de dilución} \times \text{Volumen suspensión}]}{5 \text{ cuadrantes}}$$

A continuación se siembran en frascos de cultivo o en las placas para ensayo y se incuban a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. La densidad celular adecuada depende de las necesidades de cada experimento.

#### **2.2.2.3. CONGELACIÓN CELULAR**

Las células se almacenan congeladas en suero fetal bovino (FBS) suplementado con glicerol al 10%, como agente crioconservador. Para congelarlas, se lavan con PBS y seguidamente se tripsinizan. La acción de la tripsina (*Gibco, Invitrogen*) se detiene al añadir medio de crecimiento al 10%. Posteriormente se centrifugan y el pellet formado se resuspende con medio de congelación. Las células resuspendidas se pasan a un vial de crioconservación. El proceso de congelación debe ser gradual para minimizar el daño celular, primero se mantienen a -20°C durante 24 horas y posteriormente a -80°C durante al menos una semana y hasta un tiempo máximo de 2 meses. Finalmente, para una congelación más duradera se almacenan en nitrógeno líquido (fase líquida: -196°C; fase vapor: -130°C).

#### **2.2.2.4. DESCONGELACIÓN CELULAR**

La descongelación se realiza de forma rápida para evitar la formación de cristales de hielo durante la rehidratación, pasando los viales directamente del nitrógeno líquido a un baño a 37-40°C. Una vez descongeladas, las células se resuspenden en el medio de cultivo específico para cada línea celular para evitar la toxicidad del glicerol. Se centrifugan a 800 rpm durante 5 minutos y se elimina el sobrenadante. El pellet celular se resuspende en el medio de cultivo al 10% y se siembra en frasco de cultivo en el que

previamente se adiciona el medio correspondiente. Se incuba a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. El medio es sustituido por medio nuevo a las 24 horas para eliminar los posibles restos de medio de congelación y células muertas para optimizar el crecimiento celular. Las células se mantienen cambiando el medio cada 2-3 días hasta unos 10 días después y ya se pueden utilizar para experimentación.

#### **2.2.2.5. TRATAMIENTO CELULAR**

Las líneas celulares PC12 y U373-MG previamente sembradas en la placa correspondiente, se preincuban con los aceites esenciales o con los monoterpenos objeto de estudio con medio de mantenimiento al 1%, durante 24 horas, a las concentraciones seleccionadas. Posteriormente, se estudia el efecto neuroprotector de las células en un modelo de estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, durante 30 minutos, a una concentración 0,1 mM en células PC12 y 1 mM en células U373-MG. Estos cultivos celulares se utilizan para los estudios de: determinación de la viabilidad celular, generación y captación de ROS, determinación de proteínas, determinación de enzimas antioxidantes, expresión de proteínas por medio de la técnica de Western Blot, determinación de la peroxidación lipídica y actividad de caspasa-3.

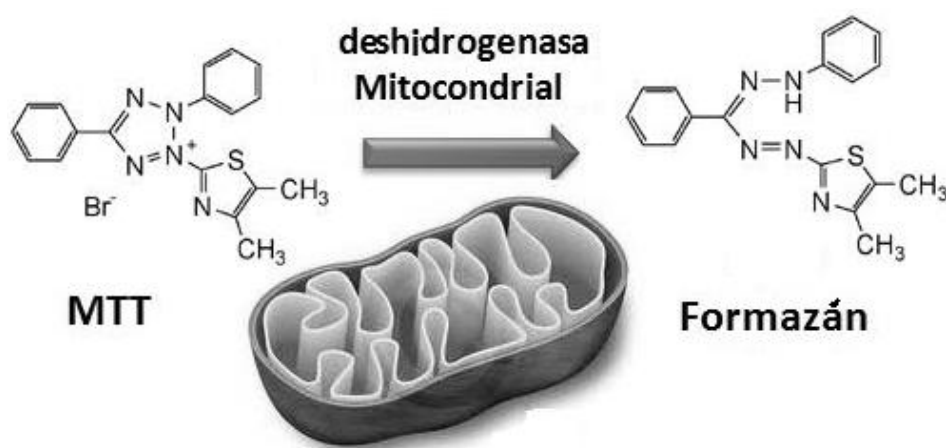
### **2.2.3. Estudio de citotoxicidad: ensayo de reducción de MTT**

#### **▪ Fundamento**

Para evaluar cuantitativamente la viabilidad de las células tratadas con aceite esencial o los monoterpenos en estudio, se utiliza el método colorimétrico de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (*Mosmann, 1983*).

Este método se basa en que la sal de tetrazolio, MTT, soluble en agua y de color amarillo se reduce a una sal de formazán por acción de las enzimas deshidrogenasas

mitocondriales. Esta reducción es indicativa del metabolismo celular, ya que la reacción redox se produce por deshidrogenasas mitocondriales de células vivas únicamente (Takahashi *et al.*, 2002) (**Figura 21**). El formazán actúa como aceptor de electrones desde equivalentes reducidos celulares. Este formazán precipita formando unos cristales violetas insolubles en agua en el interior de las mitocondrias de las células, pero se solubiliza con dimetilsulfóxido (DMSO).



**Figura 21. Reducción del MTT.** La sal de tetrazolio se reduce a formazán por las deshidrogenasas mitocondriales.

La cantidad de formazán generada es directamente proporcional al número de células vivas. Por tanto, cuanto mayor sea esta relación, mayor será la intensidad del color, y por tanto, mayor la absorbancia que se determina espectrofotométricamente ( $\lambda=550$  nm) (Mosmann, 1983). Como control negativo se ha empleado en este método colorimétrico el Tritón X-100, que es un agente surfactante que rompe las membranas lipídicas de las células provocando su muerte.

#### ▪ **Reactivos**

- Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (MTT) (*Sigma-Aldrich, España*)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (*Panreac Química, España*)
- Tritón X-100 (*Sigma-Aldrich, España*)

▪ **Método**

1. Determinación de la viabilidad celular

La línea celular PC12 (20.000 células/pocillo) y U373-MG (50.000 células/pocillo) se siembran en placas de 96 pocillos y se incuban a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas, tiempo en el que alcanzan el 80-90% de confluencia. A continuación, las células se tratan con diferentes concentraciones de los aceites esenciales o los compuestos aislados durante 24 horas. Como control negativo se usa tritón al 5%. A continuación, se elimina el medio y se adiciona una disolución de MTT (2 mg/ml en PBS) y medio de cultivo 10%. Se deja incubar una hora a 37°C y se adiciona DMSO para disolver los cristales de formazán. La medida se realiza espectrofotométricamente a  $\lambda=550$  nm en el Lector de placas Digiscan 340 mediante el programa Digiwin 3.

2. Evaluación de la actividad citoprotectora frente a la toxicidad inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Se determina la viabilidad celular en un modelo de daño celular inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El procedimiento es igual al realizado en el apartado anterior, incorporando 24 horas después del pretratamiento con las muestras en estudio, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 mM para PC12 y 1 mM para U373-MG), sometiendo así a las células a un estrés oxidativo inducido. Las células se incuban durante 30 minutos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tiempo considerado suficiente para producir daño en las células (*Desagher et al., 1996*). 24 horas después, se realiza el ensayo de MTT en las mismas condiciones experimentales utilizadas anteriormente. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> genera radicales libres que a su vez ejercen efecto tóxico sobre las células.

Los resultados obtenidos se expresan como % de viabilidad, considerando como 100% de viabilidad la media de las absorbancias de los pocillos con células no tratadas con los productos en estudio.

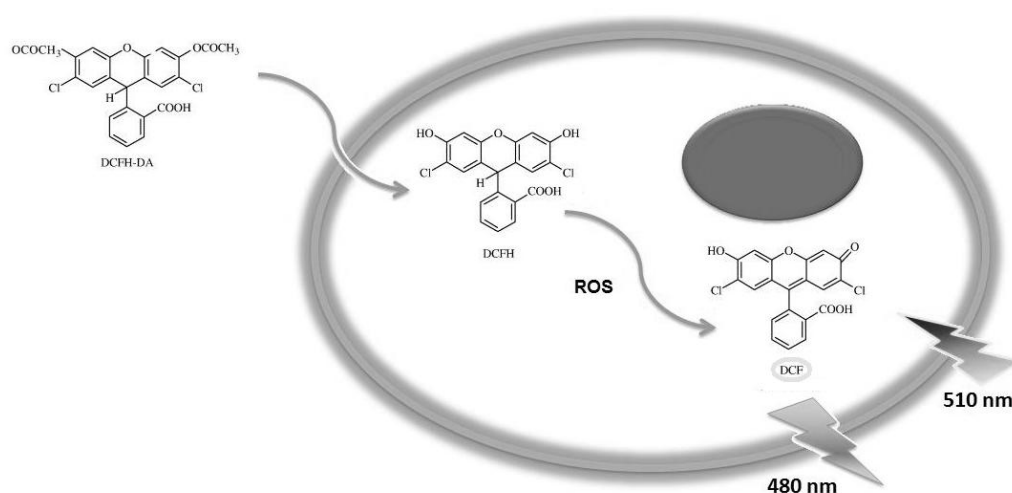
## 2.2.4. Estudio de la morfología celular

El estudio de la morfología celular se realiza con un microscopio de contraste de fases (objetivo 40x). Las imágenes se capturan con una cámara digital MOTIC Moticam.

## 2.2.5. Determinación de la generación de ROS: ensayo de la diclorofluoresceína (DCFH-DA)

### ▪ Fundamento

La medida de la generación intracelular de radicales libres se realiza con 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA), que es una molécula neutra, no fluorescente, que atraviesa las membranas celulares por difusión pasiva. Se hidroliza en el citoplasma por las esterasas intracelulares no específicas, perdiendo los grupos acetilo, y pasa a 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH). Este compuesto intermediario, en presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) del interior de la célula como  $H_2O_2$ , es susceptible de ser oxidado a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) que es un compuesto altamente fluorescente (**Figura 22**).



**Figura 22. Medida de la generación intracelular de ROS.** DCFH-DA es una molécula no fluorescente, atraviesa las membranas celulares, se hidroliza en el citoplasma a DCFH. Este compuesto intermediario, en presencia de ROS, es susceptible de ser oxidado a DCF que es un compuesto altamente fluorescente. Se emplea una  $\lambda_{exc}=480$  nm y  $\lambda_{em}=510$  nm.

La fluorescencia intracelular de la diclorofluoresceína permite cuantificar la formación de especies reactivas de oxígeno y el estrés oxidativo producido en las células, ya que la intensidad de la fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de especies reactivas de oxígeno generadas (*Wang & Joseph, 1999; LeBel et al., 1992*).

▪ **Reactivos**

- 2', 7'- diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (*Sigma-Aldrich, España*)
- Glucosa (*Panreac Química, España*)
- Solución de fosfato salino (PBS) (*Gibco, Invitrogen, UK*)

▪ **Método**

Para el estudio de la actividad antirradicalaria las células se incuban hasta el 80-90% de confluencia en placas de 96 pocillos (20.000 células/pocillo para la línea celular PC12 y 50.000 células/pocillo para U373-MG). Tras 24 horas, se adicionan 200 µl por pocillo de una solución de PBS glucosado (180 mg de glucosa/100 ml PBS estéril) + DCFH-DA (se disuelven 50 µl de DCFH-DA (stock 0,01 M en DMSO) en 25 ml de PBS glucosado (protegido de la luz)). Se incuba la placa durante 30 minutos, protegida de la luz, a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente se aspiran los pocillos y se lavan con 200 µl de PBS glucosado.

A continuación, se realiza un cotratamiento con las diferentes concentraciones de aceite esencial y el tóxico, determinando la posible actividad inhibidora de las especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares, producida por las muestras en estudio en las células. El tóxico [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM para astrocitos y 0,1 mM para neuronas)] se considera como control con respecto al cotratamiento. Inmediatamente después se procede a la lectura en el Fluorímetro lector de microplacas FLx800, Bio-Tek, Instruments, Inc.

La emisión de la fluorescencia producida por la DCF es proporcional a los ROS presentes en las células. Para establecer la curva de tiempo de generación de radicales se toman medidas durante 2 horas, en el fluorímetro a una  $\lambda_{\text{exc}}=480$  nm y  $\lambda_{\text{em}}=510$  nm.

## 2.2.6. Preparación de extractos celulares totales, citosólicos y nucleares

### ▪ **Fundamento**

Los extractos totales de células en cultivo son necesarios para la cuantificación de las proteínas necesarias en las siguientes técnicas: determinación de la actividad de enzimas antioxidantes, glutatión y determinación de la expresión de proteínas por Western Blot, TBARS y caspasa-3. Las fracciones citosólica y nuclear son necesarias para la determinación de la expresión del factor Nrf2.

### ▪ **Reactivos**

- Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperanil-(1)] etanosulfónico (HEPES) (*Sigma-Aldrich, España*)
- Ácido de etileno glicol tetraacético (EGTA) (*Sigma-Aldrich, España*)
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (*Panreac Química, España*)
- Cloruro de sodio (NaCl) (*Panreac Química, España*)
- Ditioneitol (DTT) (*Panreac Química, España*)
- Fluoruro de fenilmetanosulfonio (PMSF) (*Sigma-Aldrich, España*)
- Fluoruro de sodio (NaF) (*Sigma-Aldrich, España*)
- Glicerol (*Sigma-Aldrich, España*)
- Leupeptina (*Sigma-Aldrich, España*)
- Molibdato de sodio ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ) (*Sigma-Aldrich, España*)
- Pepstatino (*Sigma-Aldrich, España*)
- Tampón fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{NaHPO}_4$ ) (*Panreac Química, España*)
- Tampón fosfato salino (PBS) (*Gibco, Invitrogen, España*)



- TRIS (*Sigma-Aldrich, España*)
- Tritón X-100 (*Sigma-Aldrich, España*)
- Vanadato de sodio ( $\text{NaVO}_4$ ) (*Sigma-Aldrich, España*)

▪ **Método**

Para la obtención de los extractos celulares, las células se siembran en placas Petri, a una concentración de 20.000 células/placa para la línea celular PC12 y de 40.000 células/placa para U373-MG. Posteriormente se realizan los tratamientos con los aceites esenciales (15 y 50  $\mu\text{g/ml}$ ) o los compuestos aislados (10 y 25  $\mu\text{M}$ ) objeto de estudio, y 24 horas después con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,1 mM para PC12 y 1mM para U373-MG) durante 30 minutos. Posteriormente se recogen las células por raspado y los extractos celulares se centrifugan a 800 rpm durante 5 min. A continuación, se desecha el sobrenadante y los pellet celulares se lavan con PBS. Se vuelven a centrifugar en las condiciones indicadas anteriormente y se elimina el sobrenadante. Los extractos celulares obtenidos se conservan a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

• Preparación de extractos celulares totales

Para la preparación de los extractos celulares totales utilizados en la determinación de la actividad y la expresión de las enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GR, GPx y HO-1), la peroxidación lipídica mediante TBARS, la actividad de la caspasa-3 y la concentración de proteínas, se lisan estos extractos celulares totales (pellets) por adición de 300  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis (pH 7,4) [TRIS 25 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 0,1% Tritón X-100 y agua destilada] en presencia de inhibidores de proteasas [20  $\mu\text{l/ml}$  de leupeptina (1 mg/ml), 35  $\mu\text{l/ml}$  de PMSF (0,5 mg/ml) y 10  $\mu\text{l/ml}$  de pepstatina (1 mg/ml)]. Posteriormente se mantienen las muestras durante 20 minutos en hielo.

A continuación, se centrifugan a 2500 rpm durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . El sobrenadante obtenido tras el lisado del extracto celular total es el que se utiliza para medición en los diferentes experimentos. Se mantiene en frío durante el desarrollo de

los diversos ensayos para evitar que se descompongan o se almacena en el congelador hasta su uso.

- Preparación de extractos celulares citosólicos

Para la preparación de los extractos citosólicos utilizados en la determinación de la expresión del factor Nrf2, los pellets se resuspenden en una solución que contiene 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM Hepes (pH 7,9), 10 mM KCl, 10 µg/ml leupeptina, 5 mM NaF, 10 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 1 mM NaVO<sub>4</sub>, 1 µg/ml pepstatina y 0,5 mM PMSF, dejándolas en hielo durante 15 minutos. Las células son lisadas con 10 µl Nonidet P-40 (0,5%) bajo agitación continua en vórtex durante 10 segundos.

Finalmente, se centrifugan (13.000 rpm, 30 segundos, 4°C) y se recogen los sobrenadantes que corresponden a fracción citosólica (extractos citosólicos). Las muestras se conservan a -80°C hasta su utilización.

- Preparación de extractos celulares nucleares

Para la preparación de los extractos nucleares utilizados también en la determinación de la expresión del factor Nrf2, el pellet obtenido en los extractos citosólicos se resuspende en una solución de 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 20% glicerol, 20 mM Hepes (pH 7,9), 10 µg/ml leupeptina, 0,4 mM NaCl, 5 mM NaF, 10 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 1 mM NaVO<sub>4</sub>, 1 µg/ml pepstatina y 0,5 mM PMSF.

Se agita durante 30 minutos en vórtex en cámara fría y, por último, se centrifuga (15.000 rpm, 5 min, 4°C) recogiendo los sobrenadantes (extracto nuclear). Las muestras se conservaron a -80°C hasta su utilización.

### 2.2.7. Determinación de la concentración de proteínas: método del ácido bicínico

#### ▪ **Fundamento**

La determinación de la concentración de proteínas totales en las muestras se realiza mediante la técnica del ácido bicínico (*Smith et al., 1985*), basada en el método descrito anteriormente por *Lowry (Lowry et al., 1951)* con albúmina sérica bovina (BSA) como patrón.

El ácido bicínico es mucho más sensible y estable que el reactivo de Folin-Ciocalteu, usado en el método de Lowry. La técnica se basa en la propiedad de las proteínas, en medio alcalino, de reducir el cobre en estado de oxidación II a estado de oxidación I de forma concentración-dependiente, lo que le permite reaccionar con el ácido bicínico y formar un complejo de color violeta que podemos registrar a  $\lambda=550$  nm.

#### ▪ **Reactivos**

- Ácido bicínico (*Sigma-Aldrich, España*)
- Albumina sérica bovina (BSA) (1 mg/ml) (*Sigma-Aldrich, España*)
- Sulfato de cobre (II) (*Sigma-Aldrich, España*)

#### ▪ **Método**

La determinación se lleva a cabo sobre extractos celulares. Éste método requiere la preparación previa de una curva patrón con concentraciones conocidas de la proteína estándar albumina sérica bovina (BSA: 1 mg/ml) en una placa de 96 pocillos. Posteriormente, se adicionan 3  $\mu$ l de los sobrenadantes de los extractos celulares de cada muestra por triplicado. Cada pocillo se completa hasta un volumen de 25  $\mu$ l con agua destilada. Finalmente, se añaden 200  $\mu$ l/pocillo de la solución reactiva de ácido bicínico y sulfato de cobre (II) (50:1), siendo el volumen final del pocillo 225  $\mu$ l. Se

incuba la placa durante 30 minutos a 37°C protegida de la luz. Posteriormente se mide en el lector de placas Digiscan 340 a una longitud de onda de 550 nm, realizando una medida puntual por colorimetría. De modo que la cantidad de complejo coloreado es directamente proporcional a la cantidad de  $\text{Cu}^{+2}$  reducido, y por tanto, a la cantidad de proteína presente en el mismo.

La concentración de proteínas de cada una de las muestras se obtiene interpolando los respectivos valores de las muestras con los valores obtenidos en la curva patrón de BSA. La concentración de proteínas se debe expresar en mg de proteína/ml de muestra.

## **2.2.8.Determinación de los niveles de glutatión: GSH y GSSG**

### ▪ **Fundamento**

El glutatión, tripéptido compuesto por cisteína, glicina y ácido glutámico, es el tiol más abundante de las células. Es el principal antioxidante no enzimático del ser humano, y se puede encontrar, según su estado de oxidación, como la forma activa, glutatión reducido (GSH) que ejerce un papel protector frente a ROS o como glutatión oxidado (GSSG) (proporción GSH-GSSG 98:2).

Para la determinación de la cantidad de glutatión (GSH y GSSG) presente en las muestras se emplea el método de *Hissin y Hilf* (*Hissin & Hilf*, 1976), adaptado para placa de 96 pocillos, empleando como fluoróforo el o-ftaldehído. Este método se basa en la capacidad del GSH para reaccionar con el OPT a un pH óptimo de 8, dando lugar a la formación de un compuesto fluorescente que se activa a una  $\lambda_{\text{exc}}=350$  nm y que presenta un punto máximo de emisión a una  $\lambda_{\text{em}}=420$  nm. Por otro lado, GSSG reacciona de forma óptima con la sonda fluorescente a un pH=12. Puesto que a pH>8 el GSH se transforma en GSSG, es necesario bloquear la forma reducida del glutatión con *N*-etilmaleimida (NEM) para determinar únicamente el GSSG presente en la

muestra biológica y no el resultante de la oxidación del glutatión en presencia de un medio básico.

▪ **Reactivos**

- Ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) (*Panreac Química, España*)
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (*Panreac Química, España*)
- Glutatión oxidado (GSSG) (*Sigma-Aldrich, España*)
- Glutatión reducido (GSH) (*Sigma-Aldrich, España*)
- Hidróxido sódico (NaOH) (*Panreac Química, España*)
- *N*-etilmaleimida (NEM) (*Sigma-Aldrich, España*)
- *o*-ftaldialdehído (OPT) (*Sigma-Aldrich, España*)
- Tampón fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (*Panreac Química, España*)

▪ **Método**

En primer lugar se homogenizan los extractos celulares totales con 300  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato-EDTA (0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,005 M EDTA, pH 8), se mantienen en hielo y se sonicán durante 10 segundos para romper las membranas celulares y poder extraer el contenido celular. A continuación, las muestras se centrifugan a 2500 rpm durante 10 minutos a 4°C, y se recogen para la determinación de proteínas, comparando con la curva patrón de BSA como se detalla en el apartado de determinación de proteínas por el método del ácido Bicínico (*Métodos 2.3.6*). Para medir los niveles de GSH y GSSG, se deben precipitar las proteínas con ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) (1%). Posteriormente se centrifugan las muestras durante 10 minutos a 14000 rpm (4°C) y se mantienen en frío.

- **Determinación del Glutatión reducido (GSH)**

Para determinar los niveles de GSH, se adicionan 50  $\mu\text{l}$  del sobrenadante obtenido anteriormente, correspondiente a cada una de las muestras en estudio, junto con 150  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato-EDTA en los pocillos de una placa de 96. A continuación,

se añaden 20  $\mu$ l de OPT (1 mg/ml en metanol), responsable de la fluorescencia, y se incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos, en oscuridad. La fluorescencia se mide a una  $\lambda$  de excitación de 350 nm y  $\lambda$  de emisión de 420 nm, en un Fluorímetro Lector de microplacas FLx800 (Bio-Tek, Instruments, Inc). Así mismo, se prepara una curva patrón de GSH [0-90 $\mu$ l de GSH 10  $\mu$ M] con tampón fosfato.

- Determinación del Glutati3n oxidado (GSSG)

Para determinar los niveles de GSSG, se adicionan 50  $\mu$ l del sobrenadante obtenido anteriormente, correspondiente a cada una de las muestras en estudio, y 3  $\mu$ l de NEM (7,5 M) para bloquear el GSH, en cada pocillo de la placa de 96. Se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Pasado el tiempo de incubaci3n, se añaden 150  $\mu$ l de tamp3n NaOH (0,1 N a pH 12), para basificar el medio. A continuaci3n se añaden 20  $\mu$ l de OPT (1 mg/ml en metanol) (responsable de la fluorescencia), para que reaccione con el GSSG presente en la muestra. La placa se incuba a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15 minutos. La fluorescencia se mide a una  $\lambda$  de excitaci3n = 350 nm y  $\lambda$  de emisi3n = 420 nm, en el Fluorímetro Lector de microplacas FLx800 (Bio-Tek, Instruments, Inc). En la misma placa preparar una curva patr3n de GSSG [0-90 $\mu$ l de GSSG 10  $\mu$ M en NaOH 0,1 N] con tamp3n NaOH.

Para calcular los niveles de GSH y GSSG, se utiliza la recta patr3n con las concentraciones conocidas de GSH y de GSSG. La medida de fluorescencia es directamente proporcional a la concentraci3n de GSH y de GSSG de cada una de las muestras.

Los resultados se expresan mediante el índice redox (IR). El IR es un parámetro calculado a partir de los niveles de las dos formas en que puede encontrarse el glutati3n en el organismo. Se expresa como el cociente entre la cantidad de glutati3n oxidado (GSSG) respecto al total (GSH+GSSG). En condiciones de estr3s oxidativo, GSSG se encuentra en mayor concentraci3n.

$$IR = \frac{GSSG}{GSH + GSSG}$$

$$\text{Nanomoles GSH o GSSG/mg proteína} = \frac{\text{Abs} \cdot \text{muestra} - a}{B \cdot X \cdot V_m}$$

A y b=parámetros de la recta de regresión (b=pendiente y a=ordenada en el origen)  
 $y = bx + a$

$V_m$ =volumen de la muestra (0,050 ml)

X= mg de proteína/ml

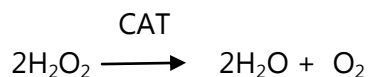
## 2.2.9. Determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes

Una vez determinado el contenido proteico de las muestras, se procedió al estudio de la actividad de las diferentes enzimas antioxidantes, expresándose los resultados en mg de proteína.

### 2.2.9.1. ACTIVIDAD CATALASA (CAT)

#### ▪ Fundamento

La catalasa es una hemoenzima antioxidante, tetramérica, que contiene 4 ferriproteínas por molécula idénticas de 60 kDa. Es una de las enzimas antioxidantes más eficaces que existen, tanto que no puede ser saturada a ninguna concentración de  $H_2O_2$ .



La actividad catalasa también llamada peróxido de hidrógeno oxidoreductasa, se determina utilizando el método descrito por Aebi (Aebi, 1984). La actividad enzimática de la catalasa se mide a partir de la descomposición de peróxido de hidrógeno (formado por la SOD y por las oxidasas flavin-dependientes) incorporado a las muestras biológicas. Según se degrada el  $H_2O_2$ , se produce la consecuente liberación

de oxígeno y agua, lo que implica un descenso continuo en la absorción del  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Por tanto, su cinética de descomposición se puede determinar espectrofotométricamente por el seguimiento de la absorbancia a  $\lambda=240$  nm.

#### ▪ **Reactivos**

- Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (*Sigma-Aldrich, España*)
- Tampón fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (*Panreac Química, España*)

#### ▪ **Método**

La mezcla de incubación contiene la mezcla de reacción (tampón fosfato:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM (pH 7,4) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  15 mM (670  $\mu\text{l}$ )) y extractos celulares totales de cada una de las muestras en estudio (30  $\mu\text{l}$ ), en un volumen final de 700  $\mu\text{l}$ . Como blanco se usa tampón fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 50 mM a pH 7,4. La reacción se inicia con la adición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  y su descomposición se determina por el descenso de la absorbancia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que es registrado a 240 nm, en una cinética de 1 minuto, a 25°C y utilizando cubetas de cuarzo de paso de luz de 1 cm (*Genesys, España*). El grado de dilución de la muestra debe ajustarse, hasta obtener varios incrementos de absorbancia consecutivos de la misma magnitud, en cada ensayo (Espectrofotómetro Uvikon 930, UK).

Los resultados se expresan como unidades de actividad CAT. Una unidad de actividad enzimática de CAT se define como la cantidad de enzima que descompone un  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por minuto, bajo condiciones específicas de temperatura (25°C) y pH (7,4). Los resultados se normalizan con la cantidad de proteínas presentes en cada muestra.

$$\text{Actividad CAT (UI/mg proteína)} = \frac{\Delta \text{ Abs/min} \cdot V_f \cdot F}{43,6 \cdot 10^{-3} \cdot V_m \cdot x}$$

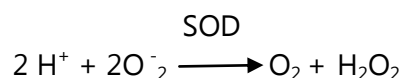


Act. CAT: Actividad enzimática específica de la catalasa  
F: Factor de dilución de la muestra  
 $V_f$ : volumen final de la mezcla de reacción en la cubeta (ml: 0,7ml)  
 $43.6 \cdot 10^{-3}$ : coeficiente de extinción molar del  $H_2O_2$  (ml/nmoles  $\cdot$  cm)  
 $V_m$ : volumen de muestra utilizado (ml: 0,030 ml)  
x: concentración de proteínas (mg/ml)

## 2.2.9.2. ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

### ▪ Fundamento

La enzima superóxido dismutasa es dimérica y se localiza a nivel de la mitocondria y del citosol. Actúa eliminando el anión superóxido y transformándolo en peróxido de hidrogeno y oxígeno, por un proceso de dismutación:



La determinación de la actividad SOD es complicada debido a la falta de disponibilidad en forma pura de su sustrato, el anión superóxido, lo que implica que  $O_2^-$  tiene que ser generado *in situ* en el sistema. Además, este anión no es detectado fácilmente por técnicas analíticas convencionales, y por lo tanto, la mayoría de las determinaciones de SOD están basadas en la inhibición de algunas reacciones químicas dependientes del  $O_2^-$ .

La cuantificación de los niveles de SOD, se realiza por la técnica del 1,2,3-bencenotriol o pirogalol (*Marklund & Marklund, 1974*). Este método consiste en la inhibición de la autooxidación de este fenol, por SOD en medio alcalino. SOD es capaz de inhibir la autooxidación del pirogalol a pH 8,2. El pirogalol rinde pirogalina (de color amarillo) y anión superóxido.

El grado de inhibición puede ser utilizado para evaluar la actividad de SOD en la muestra. Este ensayo es sensible a los cambios de temperatura y de pH, y no depende

de la cantidad de reactivos del ensayo. La presencia de glutatión, catalasa, y de metales de transición divalentes, no afecta significativamente a los resultados.

▪ **Reactivos**

- Ácido clorhídrico (HCl) (*Panreac Química, España*)
- Ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) (*Sigma-Aldrich, España*)
- Pirogalol (*Sigma-Aldrich, España*)
- TRIS (*Sigma-Aldrich, España*)

▪ **Método**

- **Reacción no catalizada.** Se valora la autooxidación del pirogalol 25 mM. Este compuesto se vehiculiza en ácido clorhídrico 10 mM, ya que a pH ácido su disolución es estable incluso durante semanas (se mantiene a 25°C, protegido de la luz y en agitación para su oxigenación). Para ello, se adiciona la solución de pirogalol sobre el tampón Tris-DPTA, pH 8,2. El DPTA es un quelante que tiene algunas ventajas con respecto a otros quelantes como el EDTA, ya que este último es ineficaz para prevenir la aceleración del proceso de autooxidación provocado por el hierro, además de eliminar las interferencias del cobre y el manganeso.
- **Reacción catalizada.** Se valora la inhibición de la autooxidación del pirogalol en presencia de la muestra. La reacción se inicia al añadir la solución de pirogalol sobre las muestras biológicas (0,025 ml), en presencia del tampón Tris-DPTA pH 8,2.

La cinética de aparición del producto de la autooxidación del pirogalol se mide por espectrofotometría (espectrofotómetro UVIKON 930, UK), variación de absorbancia a  $\lambda=420$  nm, durante 2 minutos. La medida se realiza a una temperatura constante de 25°C. Como blanco se utilizan 800  $\mu$ l de TRIS-DTPA, pH 8,2.

La diferencia en el incremento de la absorbancia entre los controles y las muestras que contienen SOD, es expresada como el porcentaje de inhibición de la oxidación. Los resultados se expresan como unidades de actividad SOD. Una unidad de actividad enzimática SOD se define como la concentración de enzima capaz de inhibir el 50% de la autooxidación del pirogallol. Los resultados se normalizan por la cantidad de proteínas presentes en cada muestra.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\Delta \text{ Abs Control} - \Delta \text{ Abs muestra}}{\Delta \text{ Abs Control}} \times 100$$

$$\text{Actividad SOD (UI / mg proteína)} = \frac{\% \text{ Inhibición} * V_f * F}{50 * V_m * x}$$

F: Factor de dilución de la muestra (1)

V<sub>f</sub>: volumen final de la mezcla de reacción en la cubeta (ml: 0,8 ml)

V<sub>m</sub>: volumen de muestra utilizado (ml: 0,025 ml)

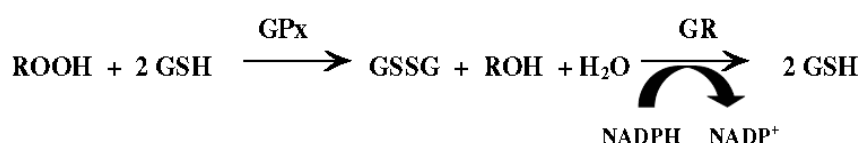
x: concentración de proteínas (mg/ml)

### 2.2.9.3. ACTIVIDAD GLUTATION PEROXIDASAS (GPX)

#### ▪ Fundamento

Esta enzima fue descubierta en 1957 por *Mills*, y se caracteriza por reducir hidroperóxidos utilizando glutatión reducido (GSH), para proteger de ese modo frente al estrés oxidativo. Existen dos formas básicas de la enzima, dependiente de selenio (GPx-Se) y no dependiente de selenio (GPx-no-Se). La primera, tetramérica, descompone los hidroperóxidos orgánicos (R-OOH) e inorgánicos (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La segunda, dimérica, sólo descompone R-OOH (orgánico). Está presente en el citosol y la mitocondria. No presenta actividad en la fracción lipídica porque el ácido graso peroxidado debe ser liberado desde la membrana plasmática al citosol por una fosfolipasa A2.

Para medir ambas actividades en un solo extracto celular se emplea el mismo método pero varía el hidroperóxido utilizado como sustrato. El ensayo con peróxido de hidrógeno determina exclusivamente la GPx-Se (*Paglia & Valentine, 1967*) espectrofotométricamente, mientras que el ensayo con hidroperóxido de cumeno como sustrato valora ambas enzimas simultáneamente (GPx total) (*Lawrence & Burk, 1976*). En ambos ensayos se mide la actividad GPx siguiendo el descenso de absorbancia a  $\lambda=340$  nm, en presencia de un exceso de glutatión reductasa, según la siguiente reacción acoplada:



Es necesario realizar una reacción no catalizada, que siempre se da aunque no haya muestra, pues en algunos trabajos se han obtenido actividades muy altas de glutatión peroxidasa, debidos al error de omitir tal reacción no catalizada (*Barja de Quiroga, 1990*). La reacción no catalizada da valores más bajos que la muestra.

#### ▪ **Reactivos**

- Azida sódica (*Sigma-Aldrich, España*)
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (*Panreac Química, España*)
- Glutatión reducido (GSH) (*Sigma-Aldrich, España*)
- Glutatión reductasa (*Sigma-Aldrich, España*)
- Hidroperóxido de cumeno (*Sigma-Aldrich, España*)
- Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) (*Sigma-Aldrich, España*)
- Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (*Sigma-Aldrich, España*)
- Tampón fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (*Panreac Química, España*)

▪ **Método**

En primer lugar, se realiza una reacción en ausencia de muestra (no catalizada) con tampón fosfato en presencia de hidroperóxido de cumeno y otra con peróxido de hidrógeno, para no sobreestimar la actividad enzimática real.

A continuación se determina la reacción catalizada, con muestra: sobre 600 µl de la solución reactiva a 25°C (14 mg azida sódica capaz de inhibir la actividad de la catalasa que también descompone  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 20 mg EDTA, en 50 ml de tampón fosfato 50 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$ , a pH 7,4 previamente burbujeada a 4°C con gas argón (*Alphagaz TM 1Ar. 1BIO. Air liquid. Pureza >99,999%*) 66 mg de GSH, 10 mg de NADPH y 27 UI glutatión reductasa), se incorporan 30 µl del sobrenadante de cada muestra. Durante 4 minutos esta mezcla se incuba a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se añaden 70 µl del sustrato (cumeno-OOH ó  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) desencadenándose así la reacción.

- **Solución de hidroperóxido de cumeno (-OOH) al 0,37%:** la preparación se realiza a partir de una solución de cumeno comercial (Fluka, *Sigma-Aldrich, España*) (37 µl), con tampón fosfato 50 mM pH 7,4 (10 ml). Protegido de la luz y a temperatura ambiente.
- **Solución de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) al 0,143%:** se prepara una solución madre que contenga 143 µl de peróxido de hidrógeno concentrado (30%) en 100 ml de tampón fosfato 50 mM pH 7,4. Se toma una solución de peróxido de hidrógeno diluido 1/7 para valorar la actividad enzimática.

Se mide el descenso de absorbancia a  $\lambda=340$  nm, durante 3 minutos, en cubetas de cuarzo, de paso de luz de 1 cm, en un espectrofotómetro UVIKON 930, UK.

Para el cálculo del incremento medio de absorbancia/minuto, se desprecia el retraso inicial (< 60 segundos) y los últimos incrementos (sólo si su valor hubiera empezado a descender sistemáticamente).

Al valor del incremento de absorbancia obtenido con cada muestra se le resta el incremento de absorbancia de la reacción no catalizada correspondiente, y el resultado obtenido se aplica a la siguiente fórmula. Los resultados se normalizan con la cantidad de proteínas presentes en cada muestra.

Los resultados se expresan como nmoles NADPH/min/ mg proteína

$$\text{Actividad GPx (nmoles NADPH/min*mg proteína)} = \frac{\Delta \text{ Abs/min} * V_f * F}{6,22 * 10^{-3} * V_m * x}$$

Act GPx: Actividad enzimática específica de la Glutación Peroxidasa

F: factor de dilución de la muestra

$V_f$ : volumen final de la mezcla de reacción en la cubeta (ml: 0,7ml)

$6,22 \cdot 10^{-3}$ : coeficiente de extinción molar del NADPH (ml/nmoles · cm)

$V_m$ : volumen de muestra utilizado (ml: 0,030 ml)

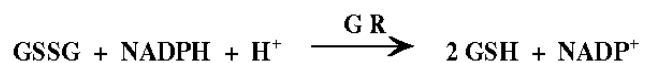
x: concentración de proteínas (mg/ml)

#### 2.2.9.4. ACTIVIDAD GLUTATION REDUCTASA (GR)

##### ▪ Fundamento

GR es una flavoproteína citosólica que se encarga de mantener los niveles intracelulares de GSH. Para determinar la actividad de esta enzima se utilizó el método de *Goldberg y Spooner* (Goldberg & Spooner, 1983). La actividad se mide espectrofotométricamente por el descenso de la GR (oxidación del NADPH catalizado por la enzima en presencia de GSSG a  $\text{NADP}^+$  y 2 GSH) a absorbancia  $\lambda=340$  nm, debido a la oxidación de NADPH y en presencia de un exceso de glutatión reductasa. GR es una flavoenzima NADPH dependiente que reduce GSSG a GSH, ya que transfiere

electrones desde GSSG hasta NADPH, el cual será usado por GPx para reducir los hidroperóxidos, según la siguiente reacción acoplada:



Es necesario realizar una reacción no catalizada, que siempre tiene lugar, aún en ausencia de muestra, pues en algunos trabajos se han obtenido actividades muy altas de glutatión, debido al error de omitir tal reacción no catalizada (Barja de Quiroga, 1990).

▪ **Reactivos**

- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (*Panreac Química, España*)
- Glutatión oxidado (GSSG) (*Sigma-Aldrich, España*)
- Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) (*Sigma-Aldrich, España*)
- Tampón fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (*Panreac Química, España*)

▪ **Método**

En primer lugar, debe realizarse, una reacción en ausencia de muestra (no catalizada) de tampón fosfato 50 mM y EDTA 6,3 mM (pH 7,4) caliente, en presencia de GSSG y NADPH, para no sobreestimar la actividad enzimática real. A continuación, sobre 580 µl de la solución de tampón fosfato (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 6,3 mM EDTA, pH 7,4) se incorporan 50 µl de la muestra diluida. Posteriormente se añaden 35 µl de GSSG 80 mM, y en último lugar 35 µl del NADPH 6 mM, el cual desencadena la reacción. Se mide la cinética del descenso de absorbancia a  $\lambda=340$  nm, durante 5 minutos (retraso 60 segundos + 4 minuto de medida), en cubetas de cuarzo, de paso de luz de 1 cm en espectrofotómetro UVIKON 930, UK.

Los resultados se normalizan con la cantidad de proteínas presentes en cada muestra.

$$\text{Actividad GR (nmol NADPH/min * mg proteína)} = \frac{\Delta \text{ Abs/min} * V_f * F}{6,22 * 10^{-3} * V_m * x}$$

Act GR: Actividad enzimática específica Glutación Reductasa

F: Factor de dilución de la muestra (en este caso 1)

$V_f$ : volumen final de la mezcla de reacción en la cubeta (en ml) (0,7ml)

$V_m$ : volumen de muestra utilizado (en ml) (0,050ml)

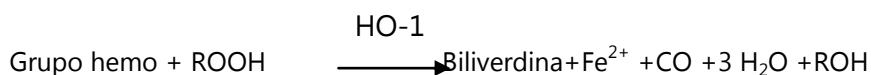
x: concentración de proteínas (en mg/ml)

### 2.2.9.5. HEMO-OXIGENASA (HO-1)

#### ▪ Fundamento

La HO fue descubierta en 1968 por *Tenhunen* (1968). Es una enzima que cataliza la degradación oxidativa del hemo. (*Morse & Choi, 2005*). Hemo oxigenasa-1 (HO-1) es una enzima que presenta funciones citoprotectoras contra el daño oxidativo. Es inducible por estímulos de estrés celular como los producidos por  $H_2O_2$ , y cataliza la degradación oxidativa del grupo hemo, dando lugar a la formación de hierro, monóxido de carbono y biliverdina, que se transforma en bilirrubina por biliverdina reductasa (BVR) (*Deshane et al., 2005*).

La generación de bilirrubina se asocia con citoprotección debido a su potente actividad antioxidante, protegiendo a las células frente a un exceso de  $H_2O_2$ , al reducir la formación del radical hidroxilo.



#### ▪ Reactivos

- Glucosa-6-fosfato (*Sigma-Aldrich, España*)
- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*Sigma-Aldrich, España*)
- Glutación reductasa (*Sigma-Aldrich, España*)



- Hemina (*Sigma-Aldrich, España*)
- Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) (*Sigma-Aldrich, España*)
- Tampón fosfato:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  +  $\text{MgCl}_2$  (*Panreac Química, España*)

▪ **Método**

Se resuspenden los pellets de cada muestra en 500  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  100 mM +  $\text{MgCl}_2$  2mM (pH=7,4)) en frío. A continuación se realizan 3 ciclos de congelación ( $-80^\circ\text{C}$ ) - descongelación ( $37^\circ\text{C}$ ). Entonces se sonicán las muestras en hielo durante 15 segundos. Seguidamente se centrifuga a 5.000 rpm durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Al sobrenadante (400  $\mu\text{l}$ ) recogido de cada muestra se deposita en otro eppendorf, se le añade la solución reactiva (200  $\mu\text{l}$ ) atemperada [2 mg proteína citosólica de hígado de rata, 10  $\mu\text{M}$  hemina (sustrato, inductor específico de la actividad y de la expresión de HO-1), 2 mM glucosa-6-fosfato, 0,2 U glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 8 mM NADPH en tampón fosfato]. A continuación, se resuspende bien y se mantiene la reacción 1 hora a  $37^\circ\text{C}$  en oscuridad. Para parar la reacción y extraer así la bilirrubina se introducen las muestras en hielo. La bilirrubina extraída se determina por diferencia de absorción  $\lambda$  a 464 nm y  $\lambda$  a 530 nm en espectrofotómetro UVIKON 930.

Extracción de proteínas del hígado de rata

Se homogenizan los tejidos (el hígado se conserva en congelador  $-80^\circ\text{C}$ ) con el tampón fosfato (1 g de tejido / 1 ml de tampón). Se centrifugar durante 20 minutos a 6500 rpm en frío ( $5^\circ\text{C}$ ). Se recogen los sobrenadantes obtenidos y se mantiene en hielo. Se utiliza la cantidad necesaria para tener 2 mg de proteína / 200  $\mu\text{l}$ .

Los resultados se normalizan con la cantidad de proteínas presentes en cada muestra.

$$\text{Bilirrubina} = \lambda_{464 \text{ nm}} - \lambda_{530 \text{ nm}}$$

$$\text{Ley de Lambert Beer: } A = E \cdot c \cdot l$$

$$\text{Coeficiente de extinción} = 40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\text{HO actividad (picomoles bilirrubina / mg de proteína / hora)}$$

### 2.2.10. Determinación de la expresión de proteínas: Western blot (WB)

- **Fundamento**

La técnica de Western Blot (WB) detecta proteínas específicas en una muestra. Es una técnica analítica semicuantitativa basado en una primera separación de las proteínas (según su peso molecular) mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, seguida de una transferencia de las proteínas a membranas de PVDF (*Bio-Rad*), detectando así la expresión de proteínas específicas en una muestra determinada por quimioluminiscencia, al ser incubadas con los anticuerpos específicos para determinar la expresión de dichas proteínas. El método se basa en la calidad del anticuerpo usado y en la especificidad que tenga para detectar una proteína (*Stark et al., 1981*).

- **Reactivos**

- Preparación muestras

- Sample buffer (5%): 1 M de Tris-HCl (*Sigma-Aldrich, España*) pH 6,8, 50% glicerol (*Sigma-Aldrich, España*), 10% SDS (*Sigma-Aldrich, España*), 14,4 mM 2-mercaptoetanol (*Panreac Química, España*), 0,1% azul de bromofenol (*Sigma-Aldrich, España*), agua destilada. Se conserva a -20°C.

- Tampón de lisis (pH 7,4): TRIS 25 mM (*Sigma-Aldrich, España*), NaCl 150 mM (*Panreac Química, España*), EDTA 1 mM (*Sigma-Aldrich, España*), 0,1% Tritón x100 (*Sigma-Aldrich, España*), csp agua destilada.

- Preparación de geles

- Gel separador, Solución A (30% p/v acrilamida (*Sigma-Aldrich, España*), 0,8% p/v bis-acrilamida (*Sigma-Aldrich, España*) en agua destilada); Solución B (2 M TRIS (*Sigma-Aldrich, España*) -HCl (*Panreac Química, España*) (pH=8,8); 10% SDS (*Sigma-Aldrich,*

España) y agua destilada); 10% persulfato amónico (*Sigma-Aldrich, España*) y TEMED 10  $\mu$ l (*Sigma-Aldrich, España*).

. Porcentaje	de acrilamida			
	10%	12%	13%	15%
<b>Solución A (ml)</b>	3,3	4	4,3	5
<b>Solución B (ml)</b>	2,5	2,5	2,5	2,5
<b>H<sub>2</sub>O destilada (ml)</b>	4,2	3,5	3,2	2,5
<b>Persulfato amónico (<math>\mu</math>l)</b>	50	50	50	50
<b>TEMED (<math>\mu</math>l)</b>	10	10	10	10

**Tabla 7. Porcentaje de acrilamida de los geles.** x= % del gel separador que necesita, en función del peso molecular de la proteína.

- Preparación del Stacking, gel concentrado: Solución A (30% p/v acrilamida, 0,8% p/v bis-acrilamida en agua destilada (*Sigma-Aldrich, España*)) (0,66 ml); Solución C (1M TRIS-HCl (pH=6,8) (1 ml); 10% SDS (*Sigma-Aldrich, España*), agua destilada (2,3 ml), 10% persulfato amónico (30  $\mu$ l) (*Sigma-Aldrich, España*) y TEMED (10  $\mu$ l) (*Sigma-Aldrich, España*).

- Electroforesis

-Tampón de electroforesis (10X): 25 mM de TRIS (*Sigma-Aldrich, España*), 192 mM de glicina (*Sigma-Aldrich, España*), 0,1 % de SDS, y agua destilada; pH 8,3.

- Transferencia

- Tampón de transferencia (10X): TRIS (*Sigma-Aldrich, España*) base 15,6 mM, glicina (*Sigma-Aldrich, España*) 120 mM, agua destilada; pH 8,1- 8,4.

- Inmunodetección

Anticuerpos utilizados en ensayos de Western Blot:

Anticuerpo (anti)	Pm (kDa)	Muestra	% Acrilamida	Especie	Dilución	Procedencia
CAT	60	Extracto Total	10	mouse	1:1000	Sigma-Aldrich
SOD	20-22	Extracto Total	10	mouse	1:1000	Sigma-Aldrich
GPx	22	Extracto Total	15	rabbit	1:2000	abcam
GR	58	Extracto Total	12,5	mouse	1:3000	abcam
HO-1	32	Extracto Total	10	rabbit	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
Nrf-2	57	Exto. Citosólico y Nuclear	12	rabbit	1:500	Santa Cruz Biotechnology
$\beta$ -actina	42	Exto. Total, cito., nuclear	10-15	mouse	1:5000	Sigma-Aldrich
$\beta$ -actina	42	Exto. Total, cito., nuclear	10-15	rabbit	1:5000	Sigma-Aldrich

**Tabla 8. Anticuerpos.** Anticuerpos utilizados en Western-Blot y especificaciones para cada uno.

- PBS Western-Blot:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , NaCl (*Panreac Química, España*.)
- PBS Tween: 500 ml PBS WB; 0,5 ml Tween 20 (*Sigma-Aldrich, España*)

## ▪ **Método**

### • Preparación de geles de Tris-Acrilamida

Cada gel presenta dos partes bien diferenciadas, por un lado se encuentra el gel separador y por otro el "*stacking gel*" (la parte en la cual se depositan las muestras). Se prepara el gel separador en el porcentaje de acrilamida y en la cantidad adecuada según la proteína a analizar. Una vez que se solidifique se prepara el "*stacking gel*".

### • Preparación de las muestras

Preparación de las muestras de extractos celulares [(20  $\mu\text{g}$  de proteínas en 25  $\mu\text{l}$ ) con tampón de lisis y 5  $\mu\text{l}$  de tampón "*sample buffer*" por cada 20  $\mu\text{g}$  de proteínas de la muestra. Posteriormente los extractos de proteínas se calentaron durante 4 min en agua a 95°C, para que el SDS que lleva el tampón "*sample buffer*" provoque la desnaturalización de las proteínas.

### • Electroforesis

Mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida se separan las proteínas atendiendo a su peso molecular. Se añaden 25  $\mu\text{l}$  de muestra a cada pocillo y el marcador (*Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas*) (3  $\mu\text{l}$ ), que es

un control del peso molecular de las proteínas. La electroforesis se realiza según las siguientes condiciones voltaje constante a 100 voltios.

- Transferencia

Finalizada la electroforesis, las proteínas se transfieren del gel de acrilamida a las membranas para la electroforesis de proteínas de PVDF (*Immun-Blot™ PVDF Membrane for Protein Blotting*), en un medio de transferencia 1% durante 1 hora en frío. Las membranas que se emplean en el Western Blot se caracterizan por su capacidad de unir proteínas de forma inespecífica. En las membranas de PVDF (6 x 9 cm), la unión se basa en interacciones de tipo hidrofóbicos. Por eso deben ser humedecidas con metanol antes de exponerlas a tampones acuosos y así activar la membrana. A través de una corriente eléctrica y el tampón de transferencia, las proteínas se transfieren desde el gel hacia la membrana. La transferencia se realiza según las siguientes condiciones: amperaje constante a 350 mA, durante 60 minutos, en frío en tampón de transferencia 10% con metanol, en Mini-Protein Tetra Cell y mini-Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (*Bio Rad*). En este tiempo los voltios deben de ir descendiendo, mientras que las proteínas del gel se desplazan hacia el polo positivo y quedan reflejadas en la membrana.

- Inmunodetección

Para realizar la detección de las proteínas las membranas se incuban con los diferentes anticuerpos específicos. Para ello, con el fin de saturar los sitios de unión inespecífica la membrana se mantiene previamente durante 1 hora y 30 minutos en agitación suave a temperatura ambiente en una solución al 10% en PBS del agente bloqueante [*ECL Advance™ Blocking Agent*] (*Amersham Biosciences*). Transcurrido el tiempo de bloqueo, las membranas se lavan con PBS WB durante 30 minutos.

Entonces, para llevar a cabo la identificación de las proteínas de interés, las membranas de PVDF son incubadas con los anticuerpos primarios (anti-CAT, anti-GPx, anti-GR, anti-HO1, anti-Nrf2, y anti-SOD) para determinar la expresión de dichas proteínas diluidas en PBS WB, se mantiene en frío en agitación durante toda la noche.

Al día siguiente, se recupera el anticuerpo primario y se lava la membrana con PBS Tween al 0,1% durante 30 minutos, cambiando la solución de lavado cada 5 minutos. Tras lavar la membrana para eliminar el anticuerpo primario que no se ha unido, se expone al anticuerpo secundario durante 2 horas a temperatura ambiente. Éste reconoce de forma específica una región concreta del anticuerpo primario específico. Terminado el tiempo de incubación, se lava la membrana con PBS-Tween durante un mínimo de 30 minutos (hasta 2 horas) con cambios cada 5-10 minutos. El último lavado se realiza con PBS WB.

#### *Revelado*

La detección de las bandas de proteínas se realiza por quimioluminiscencia (ECL) usando el kit de detección ECL-Advance [Amersham *TM* ECL Advance *TM* Western Blotting Detection Kit (Lumigen *TM* TMA-6: Solution A y B)] (GE Healthcare). Es un método no radiactivo, para detectar antígenos inmovilizados usando anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa. Se prepara el ECL- PLUS para el revelado (1:1) y se revela en un analizador de imágenes (SynGene Multigenius BioImaging System). La cuantificación y el análisis relativo de las bandas de las imágenes se realizaron por densitometría usando el programa informático Image Quants. Como normalizador de carga se utiliza  $\beta$ -actina.

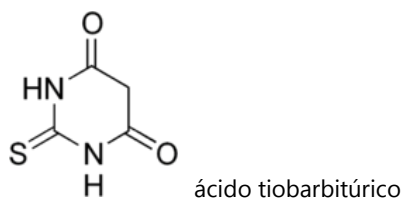
#### • Recuperación de la membrana para medir $\beta$ -actina

Se lava la membrana con PBS-Tween, ácido acético al 5% y PBS Tween para recuperar la membrana. A continuación se bloquea 1 hora, se lava con PBS WB y se coloca el anticuerpo primario de  $\beta$ -actina toda la noche. Luego se continúa como anteriormente hemos citado para otros anticuerpos.

### 2.2.11. Determinación de la peroxidación lipídica: ensayo de TBARS

#### ▪ Fundamento

Los niveles de peroxidación lipídica son determinados en las células por el método de *Mihara y Uchiyama* (*Mihara & Uchiyama, 1978*). Esta técnica se basa en la capacidad del ácido tiobarbitúrico (TBA) para reaccionar con una serie de compuestos reactivos al mismo, especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS), entre los que se encuentra el malonaldehído (MDA), principal producto final de la lipoperoxidación de las membranas de las células. Originando un compuesto coloreado, que se absorbe a  $\lambda=535$  nm. Por tanto, cuanto mayor sea el valor de absorbancia a esa longitud de onda, mayor será la concentración de TBARS en la muestra.



#### ▪ Reactivos

- Ácido tricloroacético (TCA) (*Panreac Química, España*)
- Ácido clorhídrico (HCl) (*Panreac Química, España*)
- Ácido tiobarbitúrico (TBA) (*Sigma-Aldrich, España*)

#### ▪ Método

En eppendorf se adicionan 100  $\mu$ l del reactivo TBA-TCA-HCl y 50  $\mu$ l de cada una de las muestras que son previamente congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  y descongeladas a temperatura ambiente. Se preparan 2 controles (100  $\mu$ l mezcla reactiva + 50  $\mu$ l de Tampón de lisis). Se hierve a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. La reacción se detiene en frío, introduciendo los eppendorfs en hielo. A continuación se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ , para de ese modo extraer las sustancias

reactivas al TBA. En placas de 96 pocillos, se pone la fase orgánica de cada una de las muestras, la cual contiene el complejo TBA-MDA y se mide la absorbancia en espectrofotómetro, a una longitud de onda de 535 nm. La medida de la densidad óptica es proporcional a la concentración de TBARS de cada una de las muestras. La medida de la densidad óptica es proporcional a la concentración de TBARS de cada una de las muestras. El porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica refleja el poder antioxidante de los compuestos estudiados.

### 2.2.12. Determinación de la actividad de caspasa-3

- **Fundamento**

La caspasa-3 (sustrato sintético: Ac-DEVD-AMC [N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-AMP (7-amino-4metilcumarina)]) es una proteína perteneciente a una familia de cisteína-proteasas que está implicada en las fases finales de la muerte celular por apoptosis. El producto de la hidrólisis de este sustrato es fluorescente (7-amino-4metilcumarina, AMC) y por tanto se puede relacionar la intensidad de fluorescencia con la actividad enzimática. La actividad de la caspasa-3 se mide mediante un ensayo fluorimétrico basado en la hidrólisis de los sustratos selectivos de la enzima Ac-DEVD-AMC (caspasa-3) (Talanian *et al.*, 1997).

- **Reactivos**

- Ac-DEVD-AMC (caspasa-3)  $C_{30}H_{37}N_5O_{13}$  ( $\lambda_{exc}=380$  nm;  $\lambda_{em}=460$ ) (Alexis Biochemicals, USA). Se solubiliza en DMSO (Panreac Química, España) a una concentración y se conserva, protegido de la luz, a  $-20^{\circ}C$ .

- **Método**

Para realizar el ensayo, se preparan los extractos celulares totales a los que se les aplica el tratamiento con los aceites esenciales a las concentraciones de 50 y 15  $\mu g/ml$  y monoterpenos a 25 y 10  $\mu M$  durante 24 horas y la posterior inducción de un



estado de estrés oxidativo con  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 30 minutos. Para determinar la actividad de la caspasa se utilizan placas de 96 pocillos y se necesitan 20  $\mu\text{g}$  de proteína obtenida del extracto total a los que se les añade tampón de lisis hasta un volumen final de 50  $\mu\text{l}$  y 50  $\mu\text{l}$  de una mezcla de sustrato Ac-DEVD-AMC (20  $\mu\text{M}$ ) y tampón de lisis. Las placas se incuban durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$  en oscuridad. La detección de la fluorescencia se realiza utilizando el fluorímetro lector de microplacas FL 800 Bio-Tek, a la longitud de onda específica para el sustrato ( $\lambda_{\text{exc}}=360 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}}=460 \text{ nm}$ ). Los resultados de la actividad de la caspasa-3 se expresan como % del control, considerándose como 100% al valor de la actividad de la caspasa-3 de las células control.

## 2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables estudiadas se almacenan en una base de datos del programa *Microsoft Office Excell 2007* y se tratan con el programa estadístico STATGRAPHICS plus 5.1. Los valores de todos los experimentos presentados se expresan como valores promedios  $\pm$  desviación estándar de los resultados obtenidos en ensayos independientes, valorados por triplicado. Las diferencias estadísticas son determinadas por medio del análisis de la varianza (ANOVA) simple. Se considera que la diferencia entre los grupos tratados y el control es estadísticamente significativa (\* respecto al control o # respecto al  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) cuando el valor de "t" obtenido es mayor que el tabulado para un margen de confianza del 95,0 % ( $p<0,05$ ). En el caso de que la diferencia respecto al grupo control no sea significativa no se emplea ningún símbolo indicativo. El método utilizado para discernir entre las medias es el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD). Con este método, hay un 5,0% de riesgo de considerar cada par de medias como significativamente diferentes cuando la diferencia real es igual a 0.

# RESULTADOS



# 1. ESTUDIO DEL ACEITE ESENCIAL DE *SALVIA LAVANDULIFOLIA*

## 1.1. ESTUDIO FITOQUÍMICO

### 1.1.1. Rendimiento del aceite esencial

El aceite esencial, extraído por destilación mediante arrastre en corriente de vapor de agua de la parte aérea de *S. lavandulifolia*, presenta color amarillo claro, olor alcanforado y sabor algo picante.

En la **Tabla 9** se recoge el rendimiento obtenido del aceite esencial para las diferentes muestras, y dependiendo del estudio realizado.

	Estado fenológico		Densidad de plantación	
	a.e. 1	a.e. 2	a.e. 3	a.e. 4
<b>Aceite esencial</b>				
<b>Rendimiento (%)</b>	1,54	1,76	2,57	1,84

**Tabla 9.** Rendimiento de las muestras de aceite esencial de *S. lavandulifolia*, según el estado fenológico y la densidad de plantación.

Como se puede observar en la **Tabla 9** en relación con el estudio de la influencia del estado fenológico, el aceite esencial obtenido de la muestra recolectada antes de la floración (**a.e. 1**) presenta un rendimiento del 1,54%; mientras que en la muestra obtenida en plena floración de la planta (**a.e. 2**) el rendimiento del aceite esencial es de 1,76%.

En el estudio de la influencia de la densidad de plantación, en el cual los aceites esenciales estudiados provienen de un cultivo con diferente distancia entre las líneas de

las plantas, el rendimiento obtenido es variable. El aceite esencial procedente del cultivo con menor distancia entre las líneas (**a.e. 3**) presenta un rendimiento del 2,57%; mientras que el aceite esencial procedente del cultivo con mayor distancia entre las líneas (**a.e. 4**), su rendimiento es del 1,84%.

### 1.1.2. Composición química

La composición química del aceite esencial se determina mediante cromatografía de gases en un Cromatógrafo Hewlett Packard 6890. Tras varias determinaciones se seleccionaron las siguientes condiciones experimentales (**Tabla 10**):

<b>Columna capilar</b>	30 m de longitud 0,320 mm de diámetro
<b>Fase estacionaria</b>	5% fenil metil-silicona
<b>Temperatura del detector</b>	250°C
<b>Temperatura inicial</b>	70°C
<b>Temperatura final</b>	240°C
<b>Gradiente de temperatura</b>	3°C/min
<b>Volumen de la inyección</b>	1 µl
<b>Presión del inyector</b>	5 atm
<b>Flujo del inyector</b>	100 ml/min
<b>Gas portador</b>	helio

**Tabla 10.** Condiciones instrumentales y analíticas del estudio llevado a cabo por cromatografía de gases.

- Influencia del estado fenológico

Se han conseguido separar 71 componentes distintos en la muestra denominada **a.e. 1** y 66 en la denominada **a.e. 2** (**Figura 23** y **Figura 24**, respectivamente).

The chromatogram displays the separation of four terpenes from the essential oil of *Eucalyptus globulus*. The x-axis represents time in minutes (0 to 50), and the y-axis represents signal intensity in pA (0 to 4000). The peaks are labeled with their retention times and corresponding chemical structures:

- 1,8-cineol** (Peak 1): Retention time 7.245 min. Structure: CC1(C)CC2(C)C1CC2
- alcanfor** (Peak 2): Retention time 10.980 min. Structure: CC1(C)CC2(C)C1C(=O)C2
- $\beta$ -pineno** (Peak 3): Retention time 7.460 min. Structure: CC1=CC2(C)CC1C2
- $\alpha$ -pineno** (Peak 4): Retention time 5.800 min. Structure: CC1=CC2(C)CC1C2

Other significant peaks are observed at retention times: 3.517, 4.647, 4.860, 5.159, 5.628, 5.985, 6.334, 6.975, 7.103, 7.864, 8.162, 9.194, 10.352, 11.447, 12.122, 12.166, 13.894, 14.438, 14.937, 15.617, 16.364, 18.990, 20.436, 21.567, 22.067, 23.482, 24.248, 25.184, 25.879, 26.281, 27.785, 28.588, 28.767, 29.299, 29.800, 30.303, 31.159, 32.895.

129

No.	Componentes identificados	a.e. 1 (%)	Rt (min)	a.e. 2 (%)	Rt (min)
1	sabineno	0,11	3,515	0,06	3,517
2	<b><math>\alpha</math>-pineno</b>	<b>10,90</b>	4,876	<b>7,52</b>	4,860
3	canfeno	6,87	5,175	6,27	5,169
4	<b><math>\beta</math>-pineno</b>	<b>9,77</b>	5,791	<b>11,83</b>	5,800
5	mirceno	7,62	6,014	3,88	5,985
6	3-octanil	0,20	6,657	0,19	6,657
7	limoneno	3,38	6,982	0,11	6,975
8	<b>1,8-cineol</b>	<b>25,20</b>	7,238	<b>31,30</b>	7,245
9	$\gamma$ -terpineno	0,24	8,096	1,36	7,864
10	1-octanol	0,20	8,764	0,20	8,764
11	linalol	0,53	9,106	0,36	9,122
12	óxido de linalol	0,08	9,726	0,17	9,185
13	<b>alcanfor</b>	<b>10,99</b>	10,936	<b>15,59</b>	10,980
14	isoborneol	0,19	11,170	0,24	11,172
15	borneol	3,67	11,657	3,51	11,657
16	terpinen-4-ol	0,49	12,497	0,77	12,516
17	lavandulol	0,20	12,716	0,16	12,722
18	verbenona	0,15	13,920	0,09	13,917
19	fenilacetato	0,12	14,452	0,07	14,454
20	linalil acetato	0,50	15,008	0,34	14,997
21	carvona	0,10	15,670	0,06	15,672
22	timol	0,68	16,346	1,06	16,364
23	acetato bornilo	0,12	19,006	0,10	18,990
24	acetato de nerilo	0,05	20,730	0,06	20,437
25	acetato de terpenilo	1,78	22,033	3,00	22,067
26	acetato de sabinilo	1,06	23,431	2,49	23,482
27	$\alpha$ -cariofileno	0,18	24,600	0,06	24,541
28	nerolidol	0,73	29,800	1,30	29,800
<b>Identificados (%)</b>		<b>86,11</b>		<b>92,15</b>	
<b>Hidrocarburos monoterpénicos</b>		<b>38,89</b>		<b>31,03</b>	
<b>Monoterpenos oxigenados</b>		<b>45,91</b>		<b>59,37</b>	
<b>Hidrocarburos sesquiterpénicos</b>		<b>0,18</b>		<b>0,06</b>	
<b>Sesquiterpenos oxigenados</b>		<b>0,73</b>		<b>1,30</b>	
<b>Otros</b>		<b>0,40</b>		<b>0,39</b>	

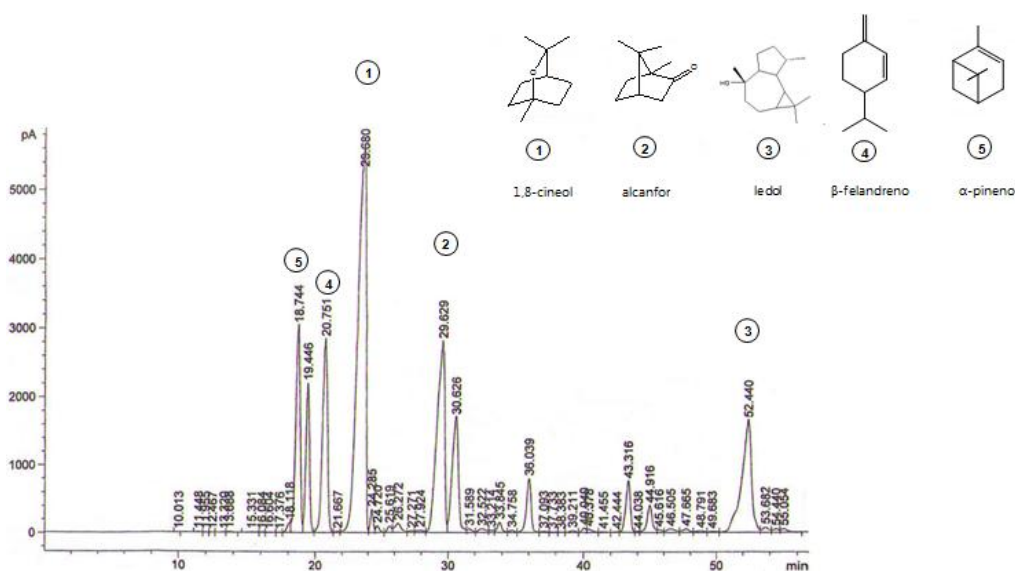
**Tabla 11. Componentes identificados (%) en las muestras a.e. 1 y a.e. 2 (*S. lavandulifolia*) y tiempo de retención (Rt) de los mismos en minutos.** En negrita se recogen aquellos presentes en mayor proporción.

En la **Tabla 11** se pueden observar los componentes identificados en **a.e. 1** y **a.e. 2** junto con su concentración en las muestras de aceite esencial y el tiempo de retención.

En la muestra **a.e. 1** se han identificado 28 componentes que representan el 86,11% del total del aceite esencial. Este aceite esencial, obtenido de muestras recolectadas en la etapa previa a la floración de la planta, se caracteriza por presentar altos niveles de monoterpenos oxigenados (45,91%) principalmente 1,8-cineol (25,20%), seguido por alcanfor (10,99%); mientras que los hidrocarburos monoterpénicos (38,89%) como  $\alpha$ -pineno (10,90%) y  $\beta$ -pineno (9,77%) se encuentran en menor proporción. En la muestra denominada **a.e. 2** se han identificado asimismo 28 componentes que representan el 92,15% del total del aceite esencial. Donde los monoterpenos oxigenados (59,37%) 1,8-cineol (31,3%) y alcanfor (15,59%) son mayoritarios; seguido por los hidrocarburos monoterpénicos (31,03%)  $\beta$ -pineno (11,83%) y  $\alpha$ -pineno (7,52%).

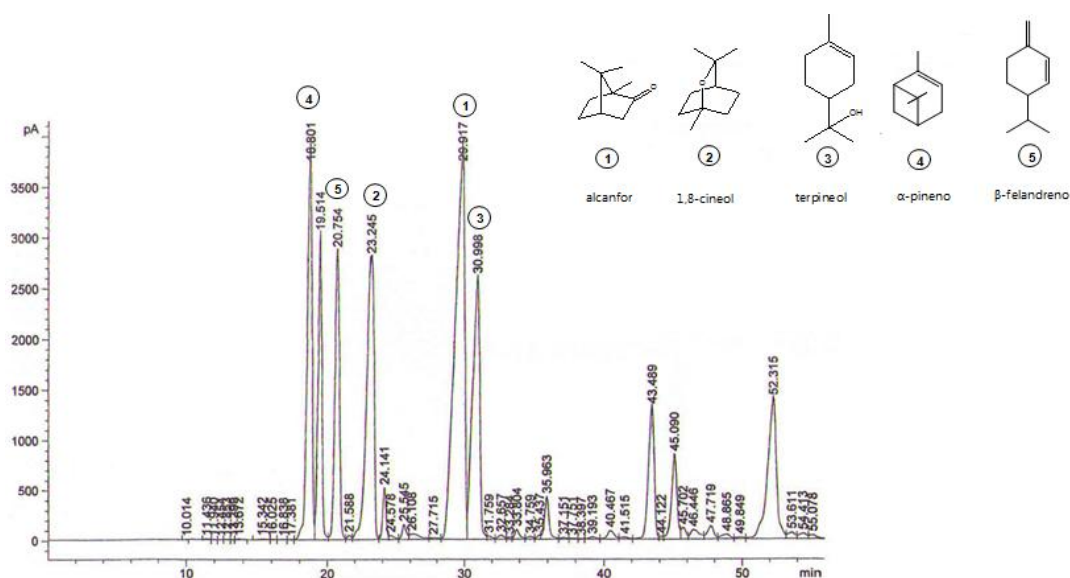
- Influencia de la densidad de plantación

Se han conseguido separar 50 componentes diferentes en las muestras **a.e. 3** y 48 en la **a.e. 4** (**Figura 25** y **Figura 26** respectivamente).



**Figura 25. Cromatograma del aceite esencial de *S. lavandulifolia* (a.e. 3).** Los picos mayoritarios según su presencia en el aceite esencial, de mayor a menor, corresponden a 1,8-cineol (1), alcanfor (2), ledol (3),  $\beta$ -felandreno (4) y  $\alpha$ -pineno (5).





**Figura 26. Cromatograma del aceite esencial de *S. lavandulifolia* (a.e. 4).** Los picos mayoritarios según su presencia en el aceite esencial, de mayor a menor, corresponden a alcanfor (1), 1,8-cineol (2), terpineol (3),  $\alpha$ -pineno (4) y  $\beta$ -felandreno (5).

En la **Tabla 12** se pueden observar los componentes identificados en **a.e. 3** y **a.e. 4** junto con su concentración en la muestra y el tiempo de retención.

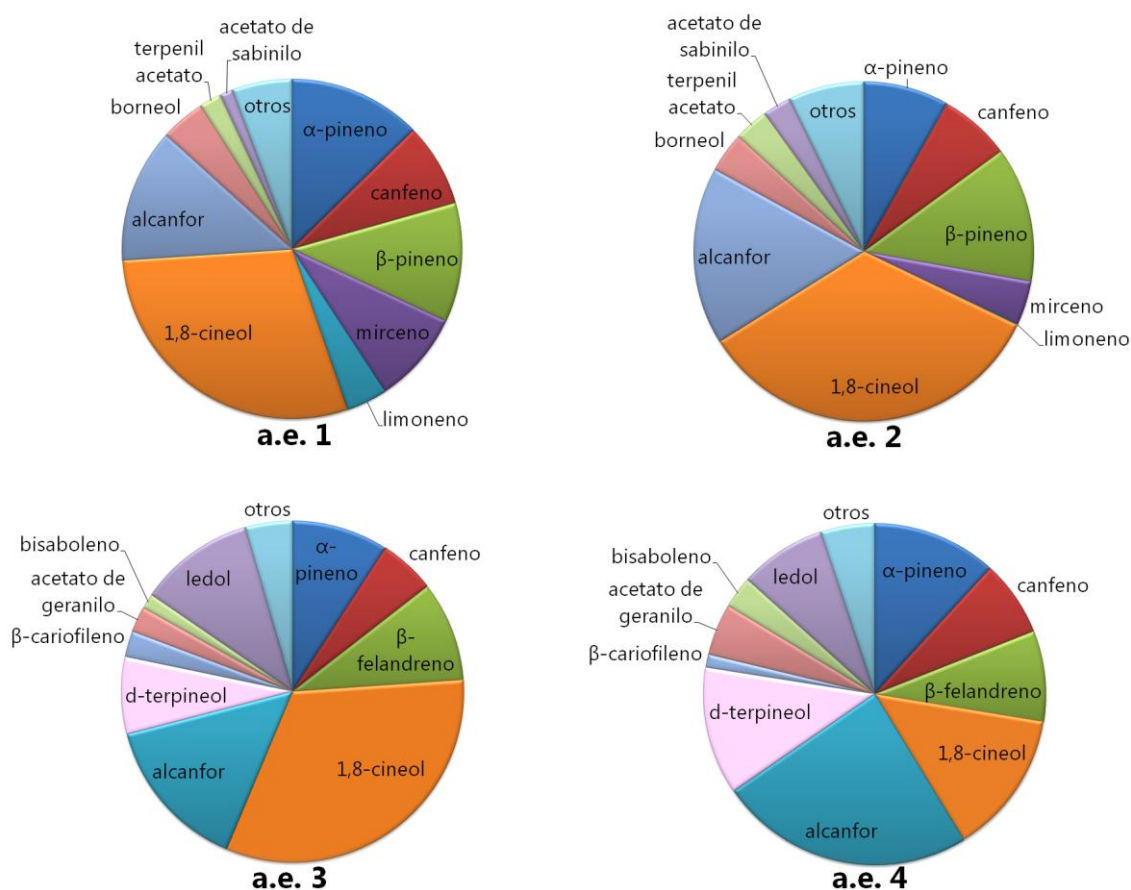
En la muestra denominada aceite esencial **a.e. 3** se han identificado 27 componentes que representan el 98,24% del total de los componentes del aceite. Presenta mayoritariamente monoterpenos oxigenados (56,83%) como 1,8-cineol (31,88%) y alcanfor (14,42%), seguido por otros compuestos como ledol (10,8%),  $\beta$ -felandreno (9,31%) y  $\alpha$ -pineno (8,99%).

En la muestra **a.e. 4** se han identificado asimismo 27 componentes que representan el 98,56% del total de los componentes del aceite. Presenta mayoritariamente monoterpenos oxigenados (54,68%), donde alcanfor (23,85%) y 1,8-cineol (13,51%) son sus componentes mayoritarios, seguido de otros compuestos como d-terpineol (11,95%),  $\alpha$ -pineno (11,67%),  $\beta$ -felandreno (8,5%) y canfeno (7,11%).

No.	Componentes identificados	a.e. 3 (%)	Rt (min)	a.e. 4 (%)	Rt (min)
1	<b><math>\alpha</math>-pineno</b>	<b>8,99</b>	18,744	<b>11,67</b>	18,801
2	canfeno	5,23	19,446	7,11	19,514
3	<b><math>\beta</math>-felandreno</b>	<b>9,31</b>	20,751	<b>8,50</b>	20,754
4	$\alpha$ -terpineno	0,06	21,667	0,10	21,588
5	<b>1,8-cineol</b>	<b>31,88</b>	23,680	<b>13,51</b>	23,245
6	$\gamma$ -terpineno	0,67	24,285	1,10	24,141
7	t- $\beta$ -ocimeno	0,24	24,720	0,12	24,578
8	t-sab-hidrato	0,58	26,272	0,35	26,108
9	tuyona	0,09	27,271	0,08	27,715
10	<b>alcanfor</b>	<b>14,42</b>	29,629	<b>23,85</b>	29,917
11	<b>d-terpineol</b>	<b>7,18</b>	30,626	<b>11,95</b>	30,998
12	borneol	0,27	32,522	0,09	31,759
13	terpineol	0,43	33,845	0,15	32,657
14	mirtenol	0,11	34,758	0,09	34,759
15	$\beta$ -cariofileno	2,41	36,039	1,22	35,963
16	eugenol	0,17	40,378	0,37	40,467
17	cuminaldehido	0,05	41,455	0,09	41,515
18	geranil acetato	2,40	43,316	4,87	43,489
19	bisaboleno	1,40	44,916	2,99	45,090
20	$\alpha$ -humuleno	0,13	45,616	0,35	45,702
21	$\alpha$ -farneseno	0,31	46,505	0,53	46,446
22	cadineno	0,24	47,665	0,52	47,719
23	viridiflorol	0,08	49,683	0,09	49,849
24	ledol	10,80	52,440	8,14	52,315
25	d-cadinol	0,32	53,682	0,28	53,611
26	t-cadinol	0,21	54,440	0,26	54,413
27	$\alpha$ -bisabolol	0,26	55,054	0,18	55,078
<b>Identificados (%)</b>		<b>98,24</b>		<b>98,56</b>	
<b>Hidrocarburos monoterpénicos</b>		<b>25,08</b>		<b>28,95</b>	
<b>Monoterpenos oxigenados</b>		<b>56,83</b>		<b>54,68</b>	
<b>Hidrocarburos sesquiterpénicos</b>		<b>4,49</b>		<b>5,61</b>	
<b>Sesquiterpenos oxigenados</b>		<b>11,84</b>		<b>9,32</b>	

**Tabla 12.** Componentes identificados (%) en las muestras a.e. 3 y a.e. 4 (*S. lavandulifolia*) y tiempo de retención (Rt) de los mismos en minutos. En negrita se recogen aquellos presentes en mayor proporción.

En la **Figura 27** se presentan la proporción de los componentes de las muestras de aceite esencial.

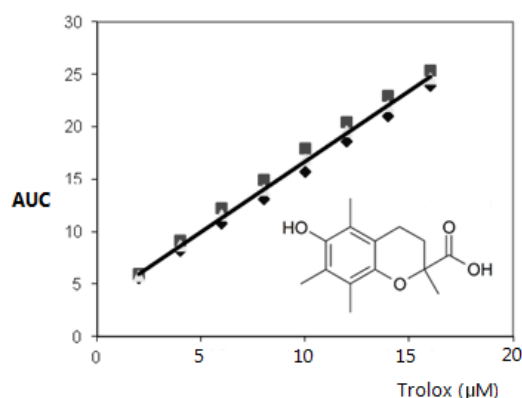


**Figura 27.** Proporción de los componentes identificados en las cuatro muestras de aceite esencial.

## 1.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA

### 1.2.1. Capacidad antioxidante

Se ha investigado la posible actividad antioxidante de las muestras de aceite esencial de *S. lavandulifolia* usando el método ORAC. En la **Figura 28** se representa la curva estándar de Trolox, con concentraciones conocidas de este antioxidante, análogo hidrosoluble de la vitamina E.



**Figura 28. Curva de calibración de Trolox.** Regresión lineal del área bajo la curva (AUC) neta a diferentes concentraciones de Trolox. ( $AUC_{\text{neta}} = AUC_{\text{muestra}} - AUC_{\text{blanco}}$ ).

A continuación, en la **Tabla 13** se muestran los resultados de los valores de ORAC obtenidos, expresados como  $\mu\text{mol Trolox/mg}$  de aceite esencial, para cada una de las muestras.

	Estado fenológico		Densidad de plantación	
	a.e. 1	a.e. 2	a.e. 3	a.e. 4
<b>Aceite esencial</b>				
<b>Valor ORAC (<math>\mu\text{mol Trolox/mg}</math>)</b>	0,339 $\pm$ 0,032	0,443 $\pm$ 0,011	0,762 $\pm$ 0,096	0,355 $\pm$ 0,014

**Tabla 13. Capacidad de captación de radicales de oxígeno (método ORAC) del aceite esencial de *S. lavandulifolia*.** Los datos se expresan como media  $\pm$  SD (n=3).

Las muestras de aceite esencial estudiadas presentan un potencial efecto antioxidante al interaccionar con las ROS, reduciendo el daño oxidativo mediante mecanismos captadores de radicales libres.

En el estudio de la influencia del estado fenológico la mayor capacidad antioxidante la presenta el aceite esencial obtenido de la muestra recolectada en plena floración (**a.e. 2**), con un valor de 0,443 frente al 0,339  $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox/mg aceite esencial de la muestra recolectada antes de la floración (**a.e. 1**).

Por otro lado, en el estudio de la influencia de la densidad de plantación, el aceite esencial **a.e. 3** (muestra obtenida de plantas cultivadas con mayor densidad de

plantación, menor distancia entre líneas) posee una alta capacidad antioxidante con un valor ORAC de 0,762  $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox/mg de aceite esencial; frente al **a.e. 4** (muestra obtenida de plantas cultivadas con menor densidad de plantación, mayor distancia entre líneas) con un valor ORAC mucho menor, 0,355  $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox/mg de aceite esencial.

Estos resultados sugieren que las muestras de aceite esencial presentan capacidad captadora de radicales peroxilo generados por la descomposición térmica del AAPH (encontrados habitualmente en los procesos de peroxidación lipídica) manteniendo durante más tiempo la fluorescencia de la fluoresceína.

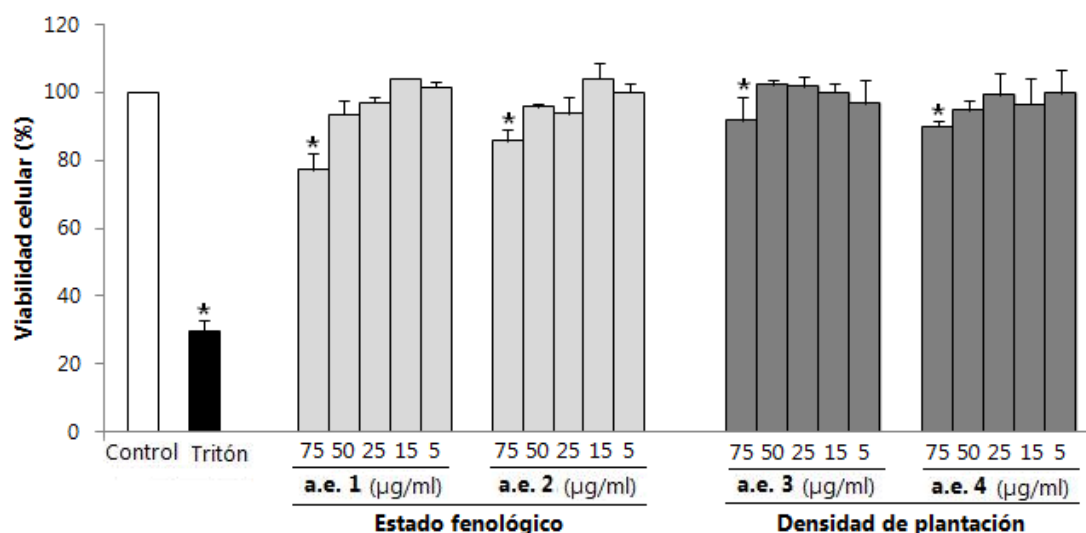
## **1.2.2. Actividad neuroprotectora sobre la línea celular PC12 en un modelo de estrés oxidativo inducido por $\text{H}_2\text{O}_2$**

### **1.2.2.1. CITOTOXIDAD CELULAR**

Previo al estudio de la actividad protectora del aceite esencial de *S. lavandulifolia* en el modelo celular de estrés oxidativo, se determina el rango de concentraciones no citotóxicas óptimas a utilizar en estudios posteriores. Para evaluar si el aceite esencial presenta toxicidad sobre la línea celular de feocromocitoma de rata (PC12) en estudio se evalúa el porcentaje de viabilidad celular *in vitro* mediante el ensayo de MTT.

Las células PC12 se tratan con las muestras de aceite esencial objeto de estudio en un amplio rango de concentraciones (75, 50, 25, 15 y 5  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 24 horas a 37°C. A continuación, se incuban con MTT durante 1 hora en oscuridad a 37°C para medir así la actividad mitocondrial. Como control positivo se utilizan células sin tratar y como control negativo se usa Tritón X-100, que produce una elevada mortalidad celular.

A continuación, en la **Figura 29**, se presentan los resultados de viabilidad celular de los aceites esenciales en estudio.



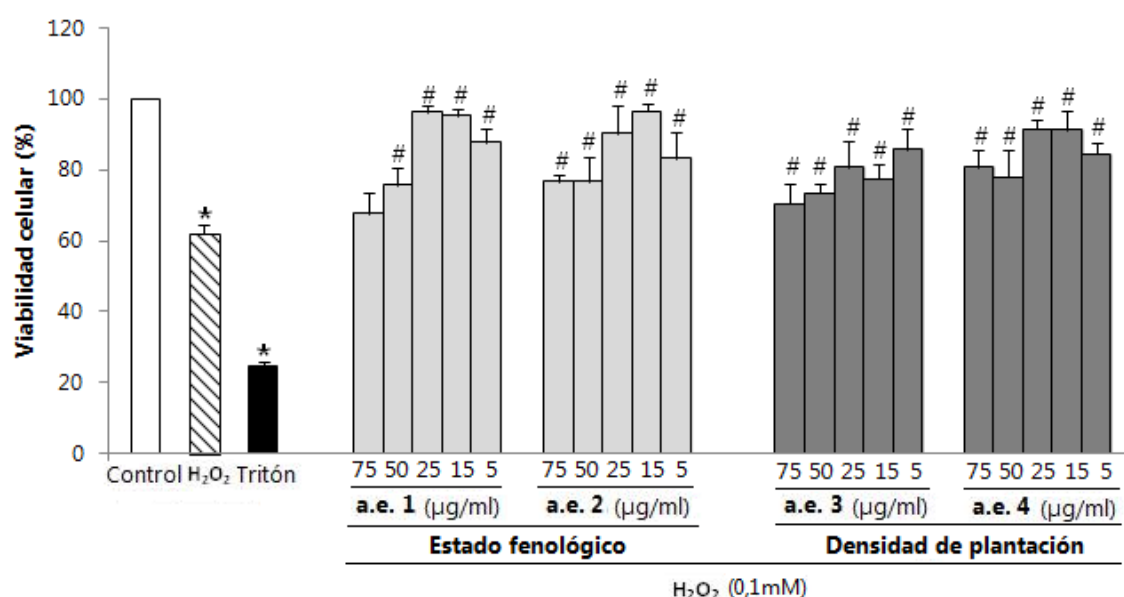
**Figura 29. Evaluación *in vitro* de los efectos del aceite esencial de *S. lavandulifolia* (a.e. 1, a.e. 2, a.e. 3 y a.e. 4) sobre la viabilidad celular.** Las células PC12 se incuban con las muestras de aceite esencial a distintas concentraciones (75-5 µg/ml) durante 24 horas. El porcentaje de células viables se determina mediante la técnica de MTT. Como control positivo se utilizan células sin tratar y como control negativo células tratadas con Tritón X-100. Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad celular, considerándose el 100% los valores obtenidos para las células no tratadas. Los datos se expresan como porcentaje de viabilidad de la media  $\pm$  SD (n=3). \* $p < 0,05$ , vs control.

Como se puede observar en la **Figura 29**, tanto en el estudio de la influencia del estado fenológico, como en el estudio de la influencia de la densidad de plantación el tratamiento en el rango de concentraciones de aceite esencial de 50-5 µg/ml no presenta efectos citotóxicos (viabilidad superior al 94%) en las muestras en estudio tras 24 horas de tratamiento, mientras que a la concentración más elevada (75 µg/ml), disminuye significativamente el porcentaje de viabilidad celular en comparación con las células control (100% de viabilidad). El Tritón X-100 presenta una reducida viabilidad celular (29,5%).

### 1.2.2.2. EFECTO PROTECTOR FRENTE A LA TOXICIDAD INDUCIDA POR H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Una vez establecido el rango de concentraciones no citotóxicas sobre la línea celular PC12, se ha evaluado el posible papel protector *in vitro* de las muestras en estudio en un modelo de estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en dichas células PC12 (modelo neuronal). El efecto citoprotector se determina, como en el apartado anterior, por el método MTT.

Las células se tratan durante 24 horas con las diferentes muestras de aceite esencial en estudio (75-5 µg/ml) y se incuban posteriormente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 mM) durante 30 minutos. Como control negativo se emplea Tritón X-100.



**Figura 30. Efecto neuroprotector del aceite esencial de *S. lavandulifolia* frente a la toxicidad inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Las células PC12 se pretratan durante 24 horas con diferentes concentraciones del aceite esencial en estudio (75-5 µg/ml) y se incuban con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 mM) durante 30 minutos. El porcentaje de células viables se determina mediante el método de reducción celular del MTT. Los datos se expresan como porcentaje de viabilidad, media ± SD (n=3). \**p*<0,05 vs control, #*p*<0,05 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Tal como se aprecia en la **Figura 30**, la exposición de las células PC12 solamente a  $H_2O_2$  tiene como consecuencia una significativa reducción de la viabilidad celular, siendo este descenso de un 60% respecto a las células control (100%), debido a la pérdida de su función mitocondrial. Mientras, el Tritón X-100 reduce la viabilidad celular a un 24,7%.

Sin embargo, el pretratamiento de las células PC12 con las diferentes concentraciones del aceite esencial durante 24 horas como paso previo a su tratamiento con  $H_2O_2$ , aumenta significativamente la viabilidad en las células. Por tanto, se produce un efecto neuroprotector sobre las células neuronales frente a la inducción de un estado de estrés oxidativo con  $H_2O_2$ , tanto en el estudio de la influencia del estado fenológico, como en el estudio de la influencia de la densidad de plantación.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos anteriormente, se seleccionan dos concentraciones, 50 y 15  $\mu\text{g/ml}$ , que no afectan a la viabilidad celular y que presentan efecto protector, para proseguir con el estudio de los posibles mecanismos mediante los cuales el aceite esencial de *S. lavandulifolia* protege a las células PC12 frente al daño oxidativo provocado por  $H_2O_2$ .

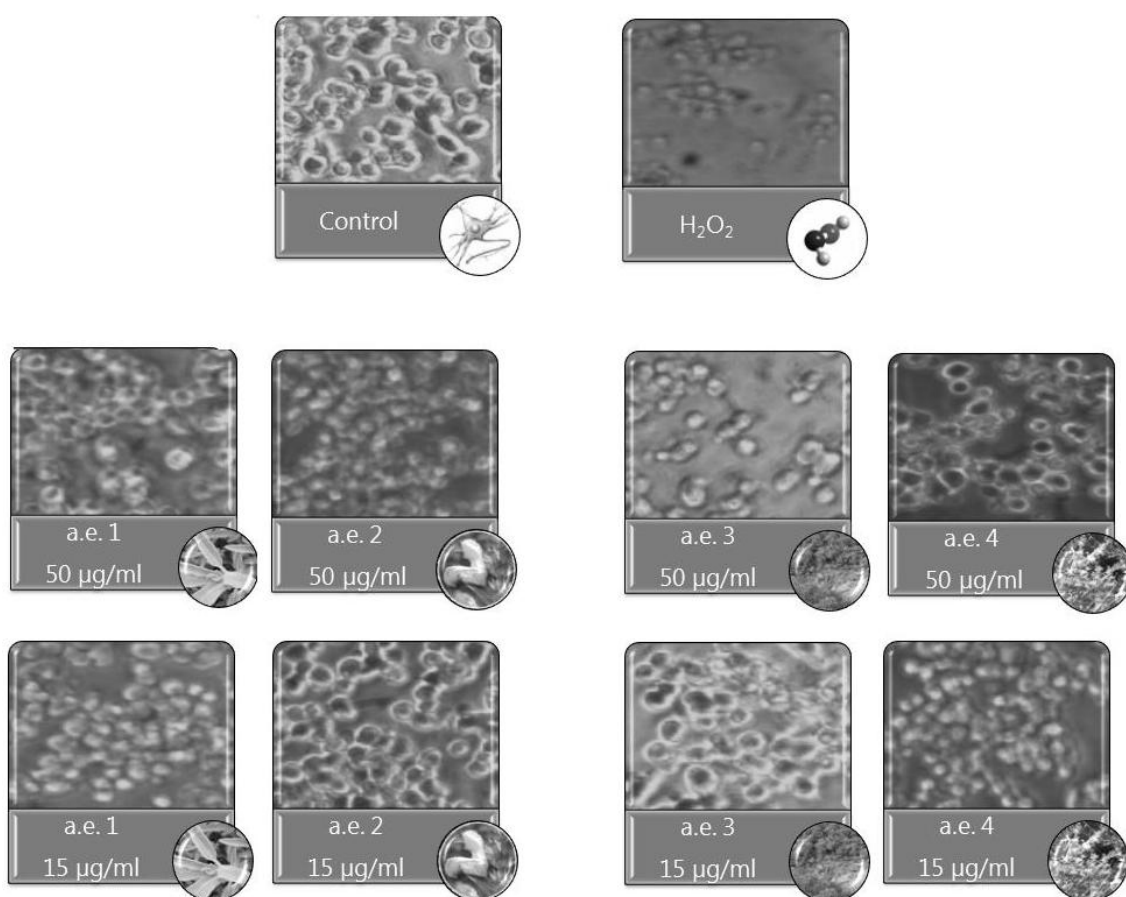
### 1.2.2.3. EFECTO SOBRE LA MORFOLOGÍA CELULAR

Para completar este estudio y confirmar la actividad protectora, se evalúan los cambios en la morfología de las células PC12 tras los tratamientos con el aceite esencial mediante un microscopio de contraste de fase (NIKON TMS).

Como se observa a continuación en la imagen de la **Figura 31**, las células control presentan una morfología redondeada y se encuentran agrupadas. Cuando se tratan con  $H_2O_2$  (0,1 mM) durante 30 minutos, las células presentan cambios en su morfología, adquiriendo formas menos circulares, de menor tamaño, así como una disminución en su agrupación y en número.



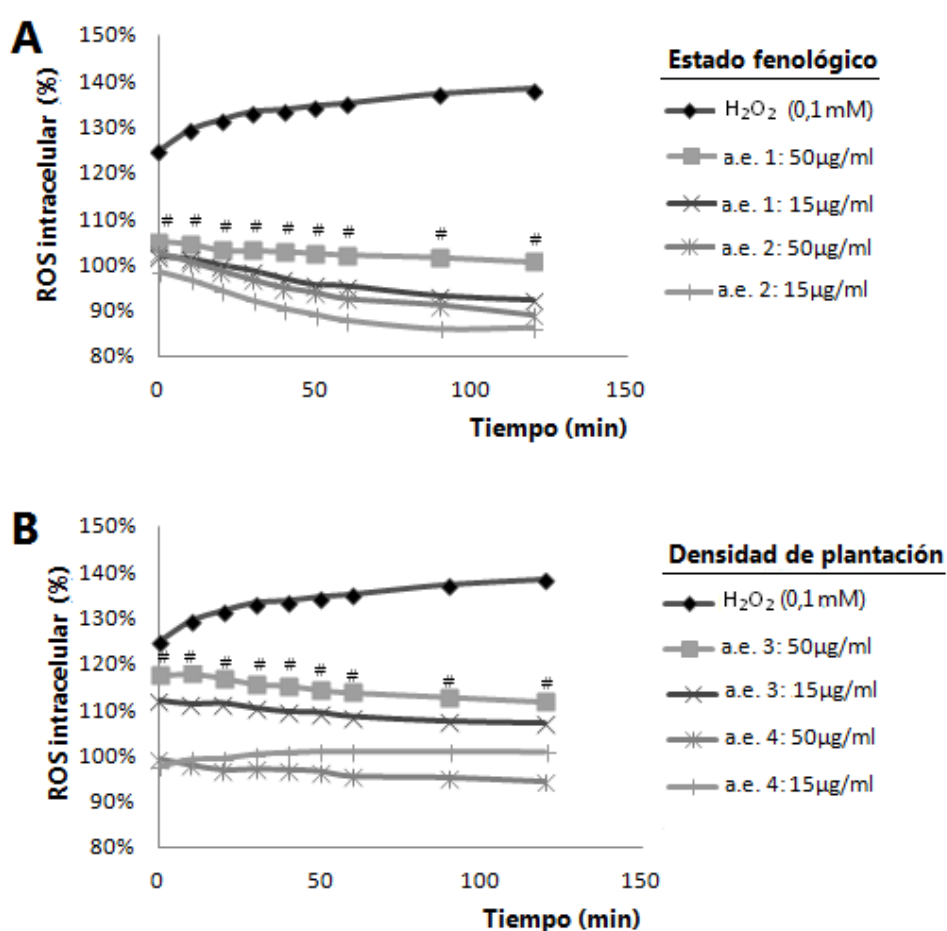
Sin embargo, el pretratamiento con el aceite esencial en estudio a las concentraciones 50 y 15  $\mu\text{g/ml}$  durante 24 horas, previo a la incubación con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , disminuye los cambios morfológicos inducidos por el mismo y atenúa la disminución en el número de células PC12. Esta atenuación de los cambios morfológicos es especialmente destacable en el estudio de la influencia del estado fenológico con **a.e. 2** a 15  $\mu\text{g/ml}$ , el aceite obtenido de la planta en plena floración. Así mismo, en el estudio de la influencia de la densidad de plantación destaca el efecto de la muestra **a.e. 3** a la concentración de 15  $\mu\text{g/ml}$ .



**Figura 31. Morfología celular.** Efecto sobre la morfología de las células PC12 de los diferentes tratamientos con aceite esencial de *S. lavandulifolia* (50 y 15  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 24 horas previo a la exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,1 mM) durante 30 minutos; así como de las células sin tratar (control) y las células incubadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  únicamente. Las imágenes corresponden a fotografías representativas de cada uno de los tratamientos, utilizando una cámara Moticam acoplada a un microscopio de contraste de fase.

#### 1.2.2.4. EFECTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ROS

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es una especie reactiva de oxígeno y fuente de otras ROS más dañinas. Se ha evaluado el efecto de  $\text{H}_2\text{O}_2$  exógeno (0,1 mM) sobre la producción intracelular de ROS; así como los niveles de ROS generados por los aceites esenciales sobre la línea celular PC12, mediante el ensayo de la diclorofluoresceína (DCFH-DA).

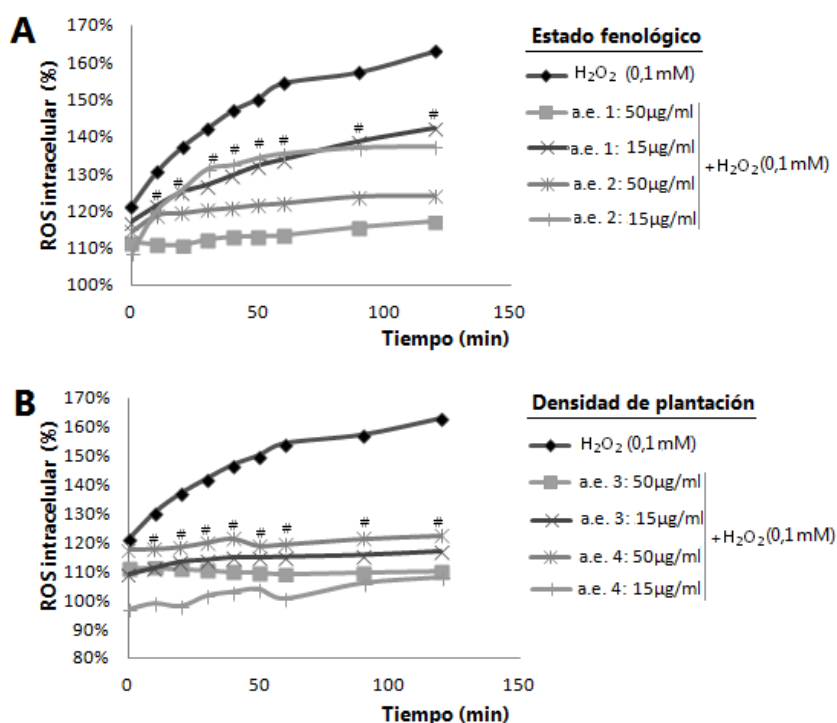


**Figura 32. Efecto del aceite esencial de *S. lavandulifolia* sobre la liberación de ROS intracelular.** Las células PC12 se incuban con DCFH-DA durante 30 minutos, en oscuridad a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$ . A continuación, se tratan con diferentes concentraciones del aceite esencial en estudio (50 y 15  $\mu\text{g/ml}$ ) procedentes **A)** del estudio de la influencia del estado fenológico y **B)** del estudio de la influencia de la densidad de plantación y se comparan con las células únicamente tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,1 mM). Los resultados se expresan como % de producción de ROS intracelulares respecto al control. Los datos se expresan como media  $\pm$  SD (n=3). # $p < 0,05$  vs  $\text{H}_2\text{O}_2$  respecto al tiempo.

Tal como se observa en la **Figura 32**,  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,1 mM) aumenta los niveles intracelulares de ROS de manera significativa de forma tiempo-dependiente en comparación con las células control, confirmando el efecto inductor de estrés oxidativo del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en las condiciones experimentales establecidas en el estudio. Al finalizar el ensayo la producción de ROS intracelular alcanza casi un 140% en las células tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El tratamiento con los aceites esenciales en estudio (50 y 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) no induce *per se* la formación intracelular de ROS, al comparar las ROS producidas en las células tratadas con los aceites esenciales y las células control.

➤ **Efecto protector frente a la neurotoxicidad inducida por  $\text{H}_2\text{O}_2$**

Para continuar con el estudio de la capacidad captadora de ROS se analiza el posible efecto protector del aceite esencial de *S. lavandulifolia* (50 y 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).



**Figura 33. Efecto del aceite esencial de *S. lavandulifolia* sobre la formación de ROS intracelular.** Las células PC12 se incuban con DCFH-DA durante 30 minutos, en oscuridad a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$ . A continuación, se tratan con las muestras de aceite esencial (50 y 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) procedentes **A)** del estudio de la influencia del estado fenológico y **B)** del estudio de la influencia de la densidad de plantación y se induce un estado de estrés oxidativo con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,1 mM). Los resultados se expresan como % de producción de ROS intracelulares respecto al control. Los datos se expresan como media  $\pm$  SD (n=3). # $p < 0,05$  vs  $\text{H}_2\text{O}_2$  respecto al tiempo.

Como se observa en la **Figura 33**, el tratamiento de las células con  $H_2O_2$  produce un aumento significativo en la liberación de ROS (hasta 163%). Sin embargo, el cotratamiento de las células PC12 con  $H_2O_2$  y los aceites esenciales, reduce de manera significativa la formación intracelular de ROS tanto en las muestras del estudio de influencia del estado fenológico como del estudio de influencia de la densidad de plantación.

#### 1.2.2.5. EFECTO SOBRE LOS NIVELES DE GSH Y GSSG

GSH es el principal antioxidante endógeno no enzimático del organismo. Cuando su concentración disminuye o aumenta la de GSSG, se produce un desequilibrio que puede producir daño oxidativo a nivel celular.

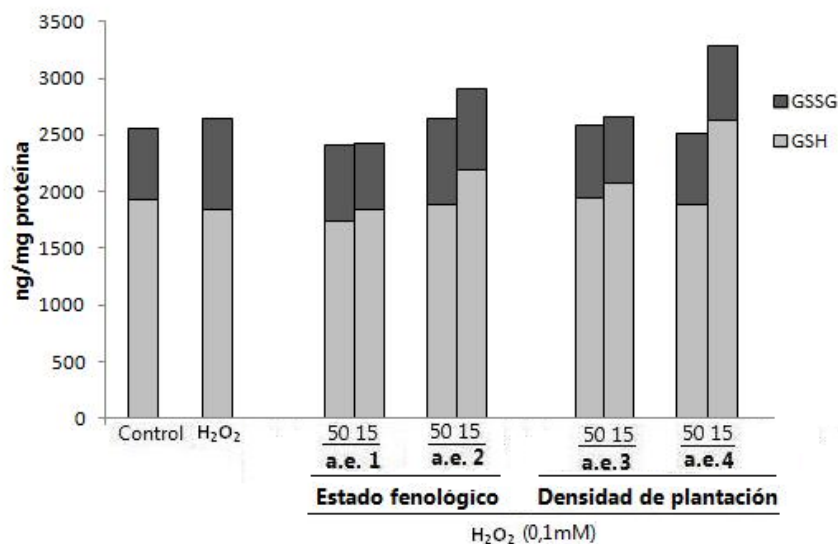
Con el fin de determinar el efecto del aceite esencial de *S. lavandulifolia* sobre los niveles de glutatión, se analizan los niveles de GSSG y GSH mediante fluorescencia. El índice redox, se expresan como IR, cociente entre la cantidad de GSSG respecto al total (GSH+GSSG).

	IR=GSSG/(GSSG+GSH)
<b>Control</b>	0,25 ± 0,05
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1mM)</b>	0,30 ± 0,01
<b>a.e. 1 (50µg/ml) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1mM)</b>	0,27 ± 0,03
<b>a.e. 1 (15µg/ml) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1mM)</b>	0,24 ± 0,07
<b>a.e. 2 (50µg/ml) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1mM)</b>	0,28 ± 0,07
<b>a.e. 2 (15µg/ml) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1mM)</b>	0,25 ± 0,04
<b>a.e. 3 (50µg/ml) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1mM)</b>	0,25 ± 0,04
<b>a.e. 3 (15µg/ml) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1mM)</b>	0,22 ± 0,04
<b>a.e. 4 (50µg/ml) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1mM)</b>	0,25 ± 0,04
<b>a.e. 4 (15µg/ml) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1mM)</b>	0,23 ± 0,11

**Tabla 14. Efecto del aceite esencial de *S. lavandulifolia* sobre los niveles de glutatión.** Las células PC12 son pretratadas durante 24 horas con las muestras de aceite esencial (50 y 15 µg/ml) e incubadas durante 30 minutos con  $H_2O_2$  (0,1 mM). El efecto del aceite esencial sobre la cantidad de glutatión se determina mediante fluorescencia utilizando OPT como marcador de fluorescencia. Los datos se expresan como media ± SD (n=3). No se encuentran diferencias estadísticamente significativas al realizar el análisis de ANOVA, con relación a la variable de las células tratadas con  $H_2O_2$ .

Como se observa en la **Tabla 14**, las células control presentan un IR del 0,25; mientras que la exposición de las células PC12 a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,1 mM) durante 30 minutos produce un IR de 0,30 y un aumento de los niveles de GSSG (**Figura 34**).

En células PC12 pretratadas con los aceites esenciales en estudio (50 y 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 24 horas, previo a la incubación con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,1 mM) durante 30 minutos, se observa una atenuación de los cambios que induce el inductor de estrés oxidativo en los niveles de GSH y GSSG. Los mejores resultados tanto en el estudio de la influencia del estado fenológico como en el estudio de la influencia de la densidad de plantación se observan a la concentración de 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (**a.e.1** con IR= 0,24; **a.e. 2** con IR= 0,25; **a.e. 3** con IR= 0,22 y **a.e. 4** con IR= 0,23), en los que este IR es menor, lo que significa que presentan menor cantidad de GSSG.



**Figura 34. Relación GSSG-GSH.** Las células PC12 se pretratan con el aceite esencial de *S. lavandulifolia* (50 y 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 24 horas y, a continuación, se incuban durante 30 minutos con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,1 mM). Los datos se expresan como media  $\pm$  SD (n= 3).

En la **Figura 34** se muestra la relación entre los niveles de GSH y GSSG en cada una de las muestras en estudio. Donde se puede apreciar un aumento significativo de la expresión de los niveles de GSH en las muestras de aceite esencial en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a las concentraciones ensayadas, especialmente destacable para la muestra **a.e. 4** a la concentración 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Los niveles de GSSG son menores para todas las muestras de aceite esencial en estudio.

#### 1.2.2.6. EFECTO SOBRE EL SISTEMA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO

Una vez evaluada la capacidad captadora de ROS de los aceites esenciales se ha determinado si este efecto protector puede ser debido a la activación o inducción del sistema antioxidante enzimático celular. Para ello, evaluamos el efecto de las muestras de aceite esencial a las concentraciones seleccionadas (50 y 15 µg/ml) sobre las principales enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPx, GR y HO-1) en las células expuestas a daño oxidativo mediado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se analiza en primer lugar la actividad del aceite esencial y a continuación su expresión proteica mediante la técnica de Western Blot.

Para ello, las células PC12 se pretratan durante 24 horas con las concentraciones seleccionadas de las muestras de aceite esencial en estudio (50 y 15 µg/ml) y se induce un estado de estrés oxidativo por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 mM) durante 30 minutos. La determinación de los niveles de enzimas antioxidantes se evalúa analizando los extractos celulares totales.

Como se observa a continuación, se muestra un marcado descenso en la actividad y expresión proteica de las enzimas antioxidantes estudiadas en células PC12 después de ser incubadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sin embargo, la actividad enzimática y expresión de proteínas aumenta significativamente tras el pretratamiento de las células PC12 con las muestras de aceite esencial a las concentraciones 50 y 15 µg/ml durante 24 horas, previo a la exposición al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1mM, 30 min).

En la **Figura 35**, se aprecia la disminución de la actividad y la expresión de proteínas de catalasa (**CAT**) en células tratadas únicamente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sin embargo, el pretratamiento con los aceites esenciales aumenta la actividad y la expresión de CAT al inducir los sistemas protectores antioxidantes, atenuando el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En el estudio de la influencia del estado fenológico la concentración 15 µg/ml de **a.e. 2**, muestra obtenida de plantas en plena floración, inhibe de forma significativa el incremento de los niveles de estrés oxidativo causado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante la inducción de los sistemas protectores antioxidantes. Así mismo, en el estudio de la

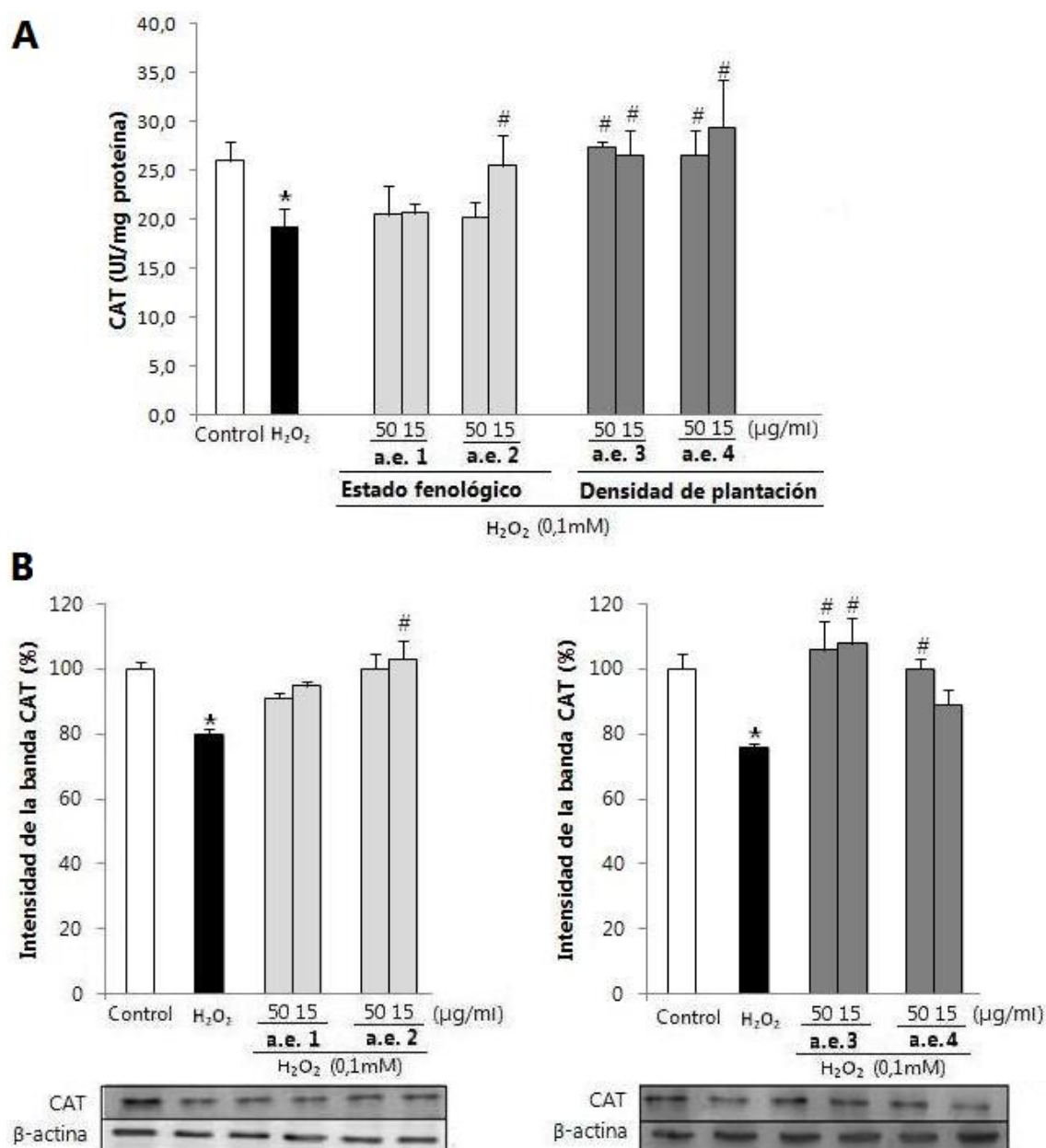
influencia de la densidad de plantación se observa que tanto **a.e. 3** como **a.e. 4** son capaces de producir esta actividad protectora frente al inductor del estrés oxidativo, de forma estadísticamente significativa.

La actividad y la expresión de proteínas de la enzima superóxido dismutasa (**SOD**) (**Figura 36**) disminuyen también en células PC12 expuestas a  $H_2O_2$  (0,1 mM) durante 30 minutos. Cabe destacar la expresión de proteínas tanto en **a.e. 1** y especialmente en **a.e. 2**, así como en **a.e. 3**.

En la **Figura 37** se muestran los resultados correspondientes a la actividad y expresión de glutatión peroxidasa (**GPx**). La exposición a  $H_2O_2$  durante 30 minutos causa una disminución significativa de la actividad de GPx. Sin embargo el tratamiento durante 24 horas con el aceite esencial previo a la exposición al inductor de estrés oxidativo,  $H_2O_2$ , aumenta significativamente la actividad de esta enzima comparadas con las células tratadas solamente con  $H_2O_2$ . Se pueden observar resultados estadísticamente significativos en **a.e. 2** y en **a.e. 3**.

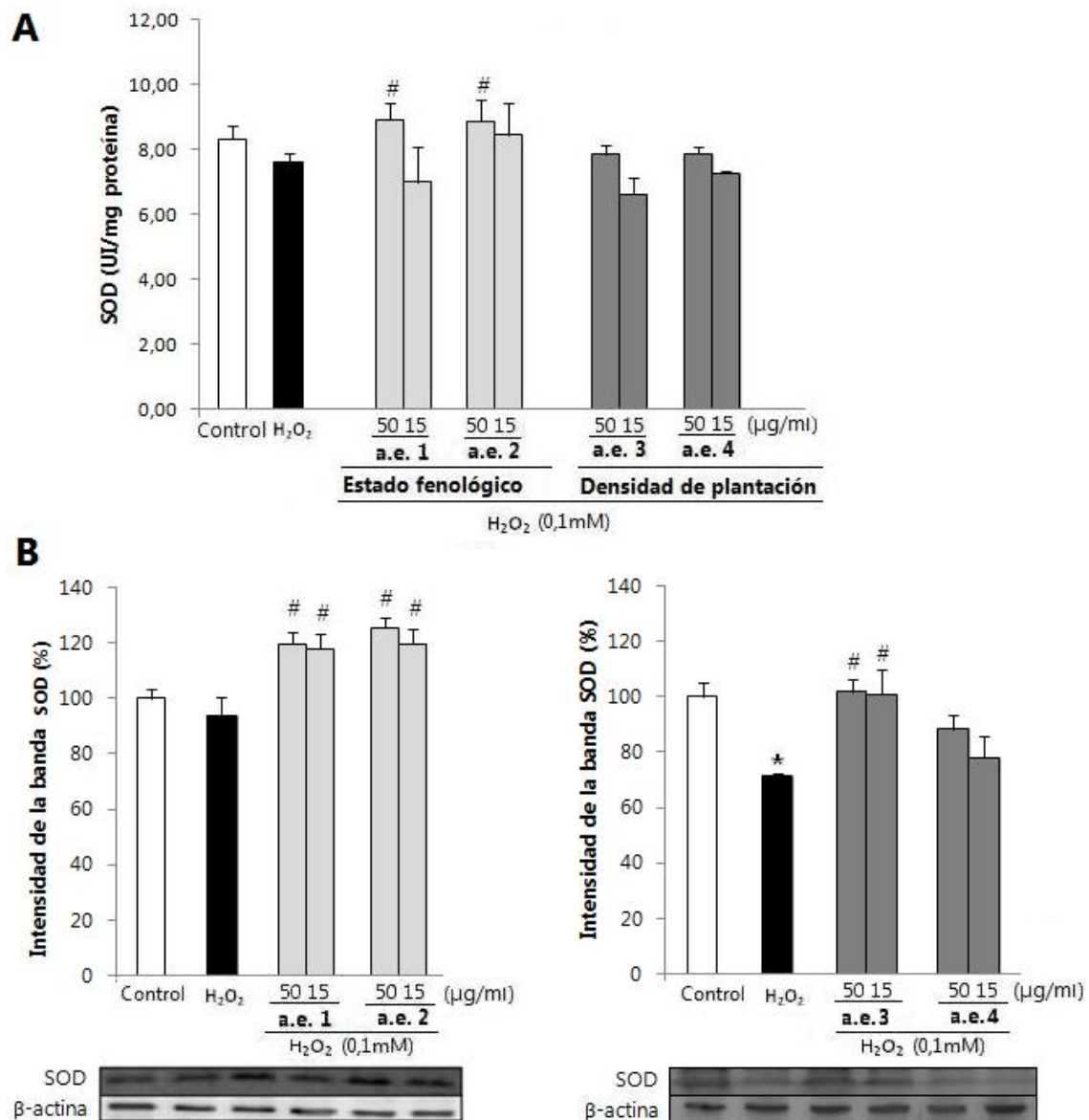
El estudio de glutatión reductasa (**GR**) (**Figura 38**), permite apreciar una significativa disminución de la actividad enzimática y de la expresión de proteínas en células PC12 tratadas con  $H_2O_2$ . Mientras la actividad y expresión de proteínas de GR aumenta significativamente en células pretratadas con los aceites esenciales previamente a la exposición con  $H_2O_2$ , especialmente en **a.e. 1** y **a.e. 2** y en **a.e. 3**.

Finalmente, se ha cuantificado la actividad enzimática y expresión de proteínas de hemo-oxigenasa 1 (**HO-1**), cuyos resultados se recogen en la **Figura 39**. Al tratar las células con  $H_2O_2$ , tanto la actividad como la expresión de proteínas de HO-1 disminuye. Sin embargo, al pretratar las células PC12 con las muestras de aceite esencial en estudio, se observa un aumento de la actividad enzimática. Una vez más, **a.e. 1**, **a.e. 2** y **a.e. 3** son las muestras de aceite esencial más activas, al ejercer un significativo efecto en la actividad enzimática.

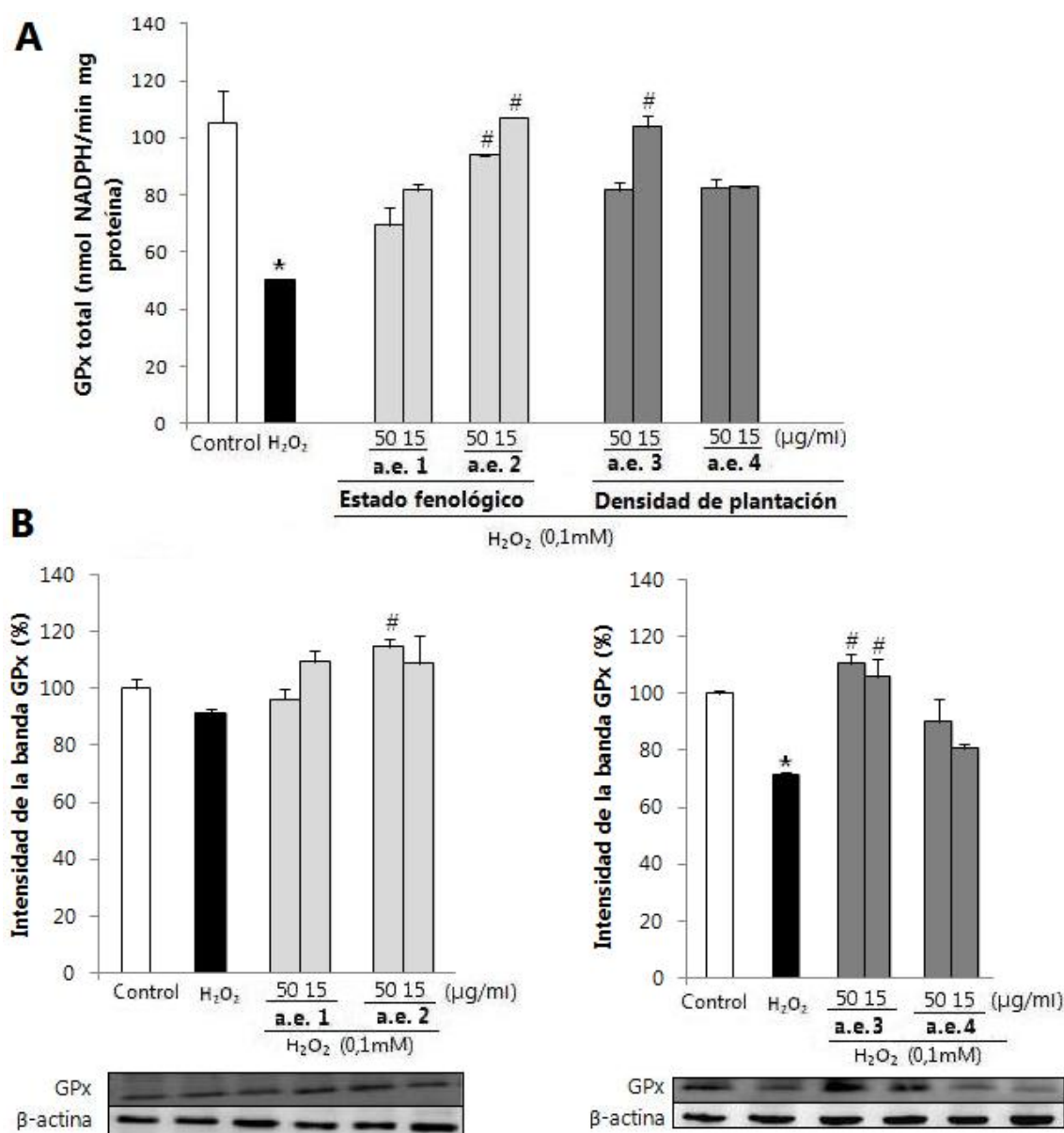


**Figura 35. Efecto del aceite esencial de *S. lavandulifolia* en la actividad y expresión enzimática de CAT.** Las células PC12 se preincubaban con las muestras de aceite esencial (50 y 15 µg/ml) durante 24 horas y posteriormente se induce un estado de estrés oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 mM) durante 30 minutos. **A)** La actividad enzimática de CAT se mide mediante espectrofotometría en extractos celulares totales. Los resultados de la actividad enzimática se expresan como UI/mg proteína. **B)** La expresión de proteínas se determinan por Western Blot en extractos celulares totales. Los resultados de la expresión de proteínas se representan como % de intensidad de banda respecto al control, que se considera 100%. Se utiliza la β-actina como normalizador de carga. En la parte inferior de la figura se representa el análisis densitométrico de una membrana representativa. Los resultados se expresan como media ± SD (n=3). \**p*<0,05 vs control y #*p*<0,05 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

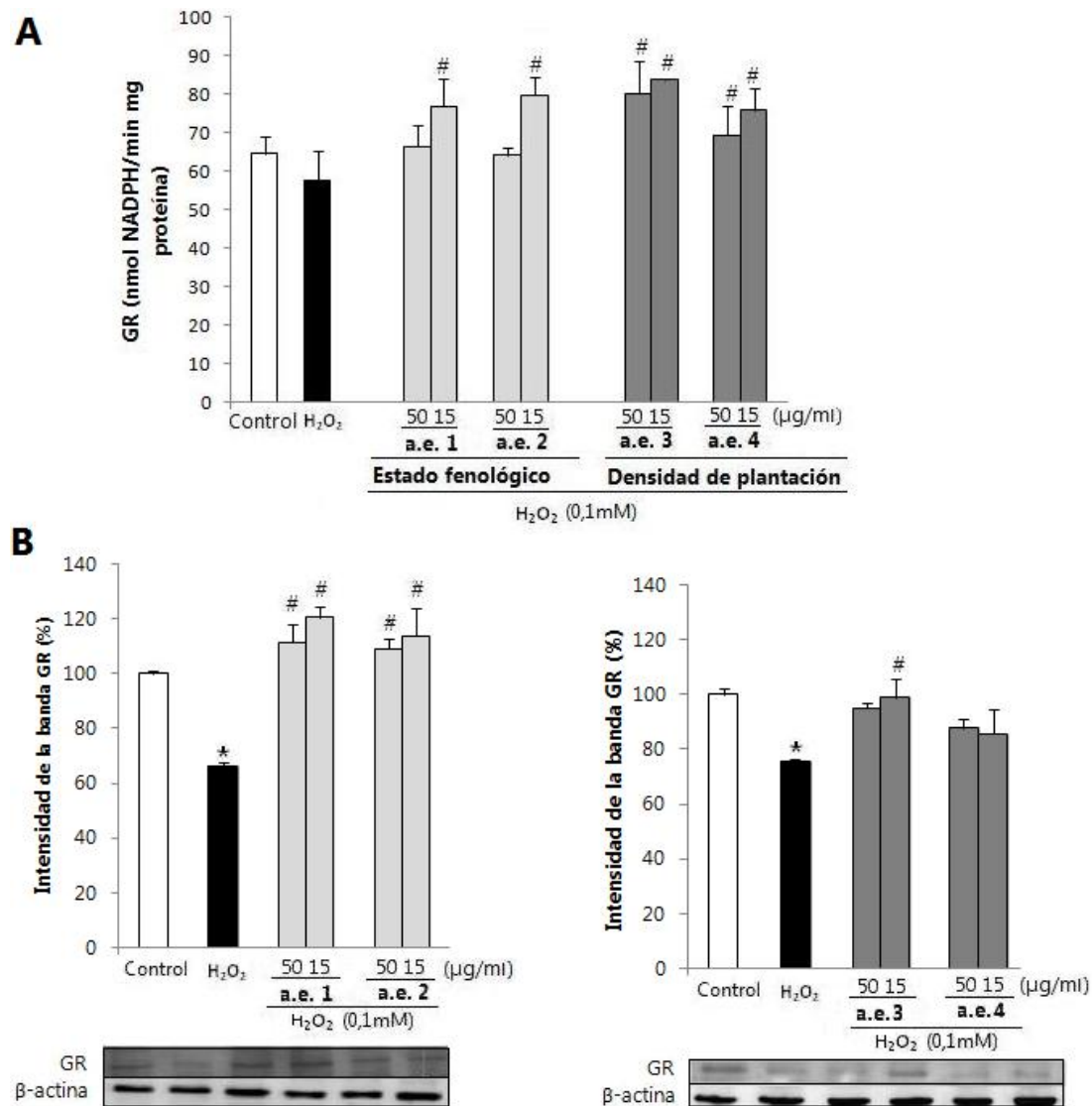




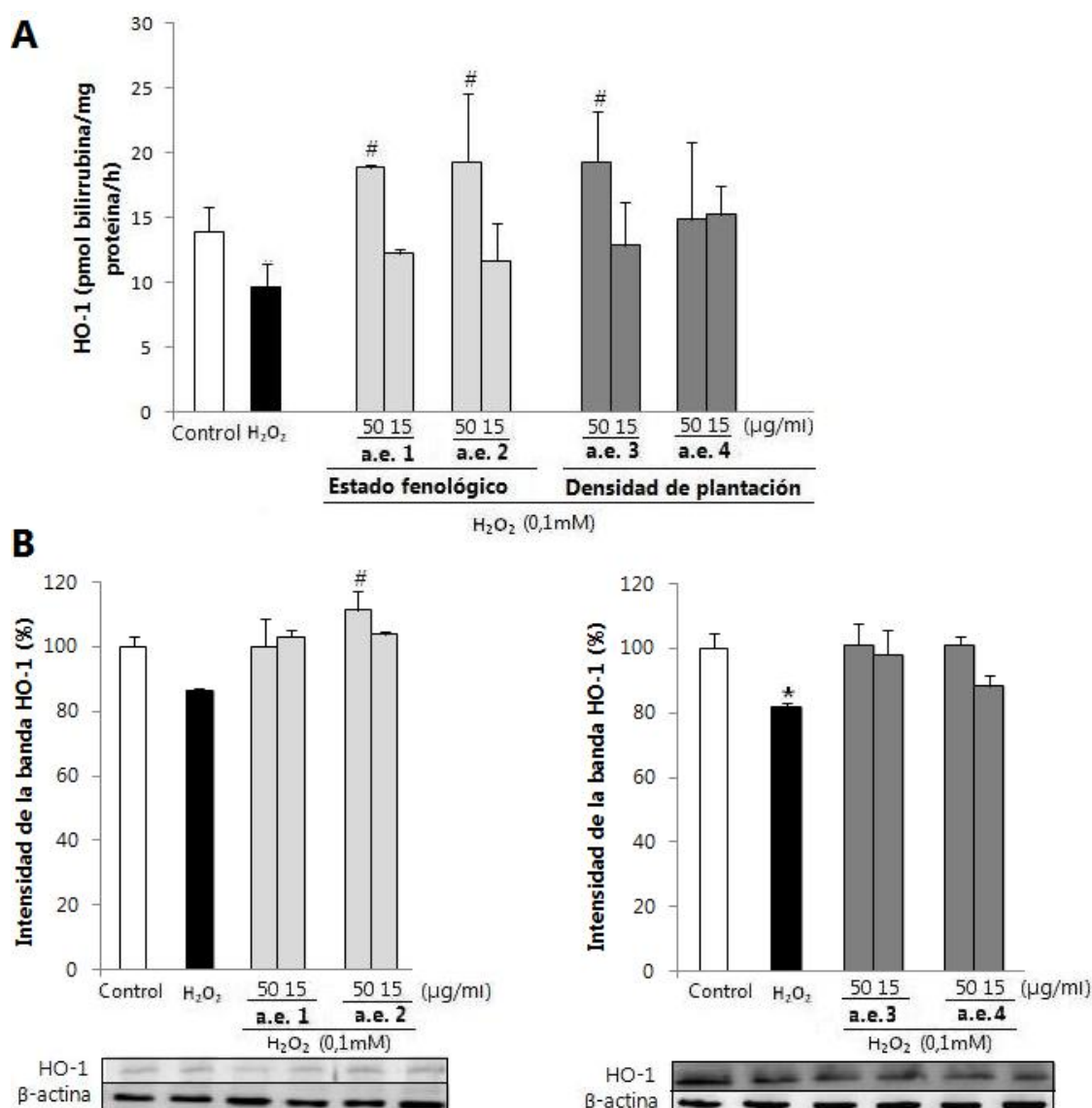
**Figura 36. Efecto del aceite esencial de *S. lavandulifolia* en la actividad y expresión enzimática de SOD.** Las células PC12 se preincubaban con las muestras de aceite esencial (50 y 15 µg/ml) durante 24 horas y posteriormente se induce un estado de estrés oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 mM) durante 30 minutos. **A)** La actividad enzimática de SOD se mide mediante espectrofotometría en extractos celulares totales. Los resultados de la actividad enzimática se expresan como UI/mg proteína. **B)** La expresión de proteínas se determinan por Western Blot en extractos celulares totales. Los resultados de la expresión de proteínas se representan como % de intensidad de banda respecto al control, que se considera 100%. Se utiliza la β-actina como normalizador de carga. En la parte inferior de la figura se representa el análisis densitométrico de una membrana representativa. Los resultados se expresan como media ± SD (n=3). \**p*<0,05 vs control y #*p*<0,05 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Figura 37. Efecto del aceite esencial de *S. lavandulifolia* en la actividad y expresión enzimática de GPx.** Las células PC12 se preincubaban con las muestras de aceite esencial (50 y 15 µg/ml) durante 24 horas y posteriormente se induce un estado de estrés oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 mM) durante 30 minutos. **A)** La actividad enzimática de GPx se mide mediante espectrofotometría en extractos celulares totales. Los resultados de la actividad enzimática se expresan como nmol NADPH/min mg proteína. **B)** La expresión de proteínas se determinan por Western Blot en extractos celulares totales. Los resultados de la expresión de proteínas se representan como % de intensidad de banda respecto al control, que se considera 100%. Se utiliza la β-actina como normalizador de carga. En la parte inferior de la figura se representa el análisis densitométrico de una membrana representativa. Los resultados se expresan como media ± SD (n=3). \**p*<0,05 vs control y #*p*<0,05 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Figura 38. Efecto del aceite esencial de *S. lavandulifolia* en la actividad y expresión enzimática de GR.** Las células PC12 se preincubaban con las muestras de aceite esencial (50 y 15 µg/ml) durante 24 horas y posteriormente se induce un estado de estrés oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 mM) durante 30 minutos. **A)** La actividad enzimática de GR se mide mediante espectrofotometría en extractos celulares totales. Los resultados de la actividad enzimática se expresan como nmol NADPH/min mg proteína. **B)** La expresión de proteínas se determinan por Western Blot en extractos celulares totales. Los resultados de la expresión de proteínas se representan como % de intensidad de banda respecto al control, que se considera 100%. Se utiliza la β-actina como normalizador de carga. En la parte inferior de la figura se representa el análisis densitométrico de una membrana representativa. Los resultados se expresan como media ± SD (n=3). \**p*<0,05 vs control y #*p*<0,05 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Figura 39. Efecto del aceite esencial de *S. lavandulifolia* en la actividad y expresión enzimática de HO-1.** Las células PC12 se preincubaban con las muestras de aceite esencial (50 y 15 µg/ml) durante 24 horas y posteriormente se induce un estado de estrés oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 mM) durante 30 minutos. **A)** La actividad enzimática de HO-1 se mide mediante espectrofotometría en extractos celulares totales. Los resultados de la actividad enzimática se expresan como picomoles bilirubina/mg proteína/h. **B)** La expresión de proteínas se determinan por Western Blot en extractos celulares totales. Los resultados de la expresión de proteínas se representan como % de intensidad de banda respecto al control, que se considera 100%. Se utiliza la β-actina como normalizador de carga. En la parte inferior de la figura se representa el análisis densitométrico de una membrana representativa. Los resultados se expresan como media ± SD (n=3). \**p*<0,05 vs control y #*p*<0,05 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

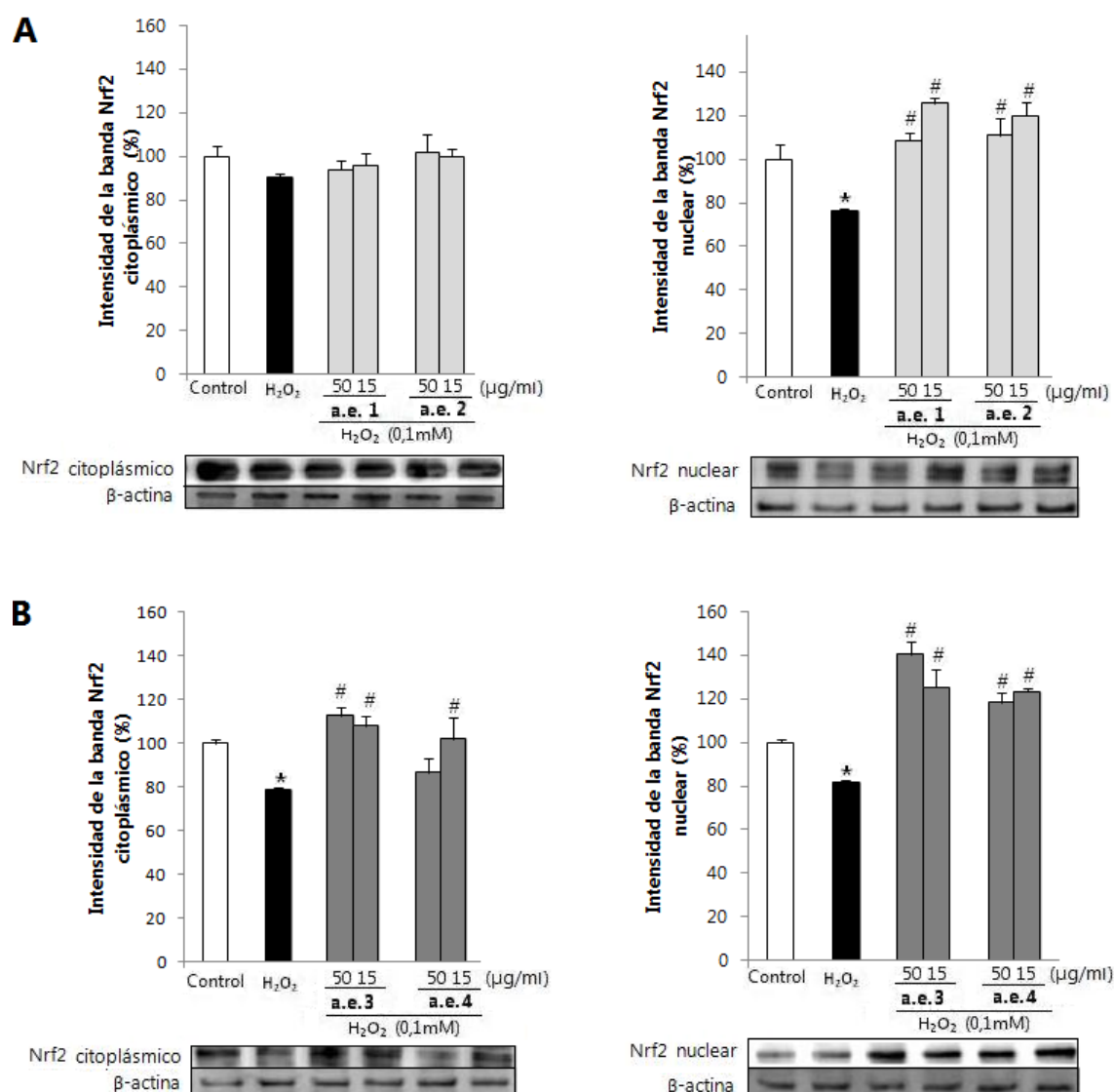
Estos resultados sugieren que el aceite esencial de *S. lavandulifolia* ejerce un efecto protector en células PC12 contra el estrés oxidativo mediante el aumento de la actividad y la expresión proteica de las enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPx, GR y HO-1), relacionándose este efecto a la inhibición en la producción de ROS intracelulares inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> demostrada previamente.

#### 1.2.2.7. EFECTO SOBRE LA VÍA NRF2

La vía de señalización Nrf2/Keap1-ARE controla la expresión de los genes relacionados con enzimas antioxidantes con potencial actividad protectora. Por tanto, para completar el ensayo y con el fin de determinar si el efecto de potenciación de las muestras de aceite esencial sobre la expresión de las enzimas antioxidantes endógenas, se realiza a este nivel, se analizan los niveles del factor de transcripción Nrf2.

Los extractos citosólicos y nucleares obtenidos tras el pretratamiento de las células PC12 con las muestras de aceite esencial (50 y 15 µg/ml) durante 24 horas y la exposición al inductor de estrés oxidativo, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 mM), durante 30 minutos, se analizan mediante Western Blot (**Figura 18**).

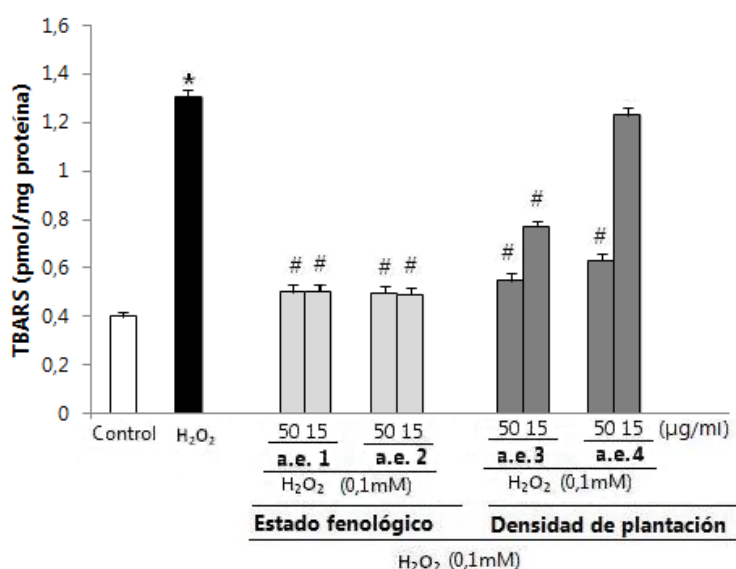
Como se observa en la **Figura 40**, el aceite esencial de *S. lavandulifolia* activa el factor nuclear Nrf2 en PC12 en comparación con las células incubadas sólo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 mM) durante 30 minutos que presentan menores niveles de expresión. Esto sugiere que esta vía está implicada en la inducción de las enzimas antioxidantes estudiadas (CAT, SOD, GPx, GR y HO-1) y por consiguiente, en la protección demostrada en los estudios realizados frente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células PC12. La muestra **a.e. 3** es la que induce la activación de la vía Nrf2 de forma más significativa.



**Figura 40. Efecto del aceite esencial de *S. lavandulifolia* sobre la expresión de Nrf2 citoplásmico y nuclear.** Las células PC12 se preincubaban con las muestras de aceite esencial (50 y 15 µg/ml) durante 24 horas procedentes **A)** del estudio de la influencia del estado fenológico y **B)** del estudio de la influencia de la densidad de plantación y se induce un estado de estrés oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 mM) durante 30 minutos. Los niveles de Nrf2 citoplásmico y nuclear se determinan por triplicado por Western Blot a partir de extractos citosólicos y nucleares, respectivamente, de células PC12. Se utiliza la proteína β-actina como normalizador de carga. En la parte inferior de la figura se representa el análisis densitométrico. Los datos se expresan como media ± SD (n= 3) y se representa como % de intensidad de banda respecto al control que se considera 100%. \**p*<0,05 vs control y #*p*<0,05 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, control de células sin tratamiento con aceite esencial.

### 1.2.2.8. EFECTO SOBRE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Uno de los mecanismos mediante el cual las ROS producen daño a nivel celular es la peroxidación lipídica. Para valorar el efecto del aceite esencial de *S. lavandulifolia* se usa el método de TBARS, que determina la peroxidación lipídica mediante la medición de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.



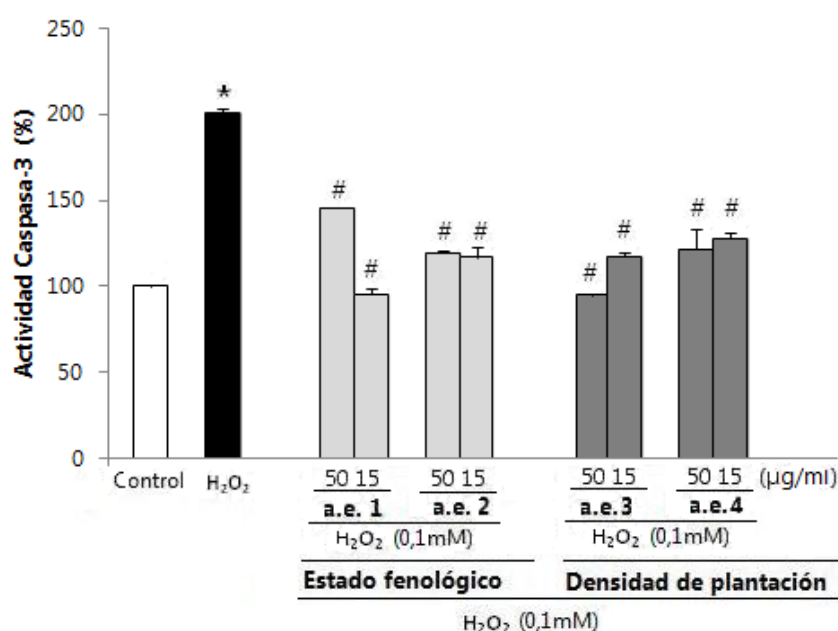
**Figura 41. Efecto del aceite esencial de *S. lavandulifolia* sobre la peroxidación lipídica.** Las células PC12 se tratan con las muestras de aceite esencial (50 y 15 µg/ml) durante 24 horas y se incuban con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 mM) durante 30 minutos. Los resultados se expresan como media ± SD (n=3). \*p<0,05 vs control y #p<0,05 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Como se muestra en la **Figura 41**, en las células PC12 expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 mM) durante 30 minutos se produce un aumento significativo de los valores TBARS (1,3 pmol/mg proteína) respecto a las células control (0,4 pmol/mg proteína). El tratamiento previo de las células PC12 con las muestras de aceite esencial a las concentraciones 50 y 15 µg/ml durante 24 horas, reduce el daño lipídico inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta reducción es estadísticamente significativa para las muestras ensayadas, destacando especialmente el efecto protector de las muestras de aceite esencial obtenidas de plantas cultivadas en el estudio de influencia del estado fenológico, **a.e. 1** y **a.e. 2**; y la muestra del estudio de influencia de la densidad de plantación **a.e. 3**. Estos resultados sugieren que las muestras de aceite esencial previenen frente al daño oxidativo mediante la inhibición de la peroxidación lipídica.

### 1.2.2.9. EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD DE CASPASA-3

Para concluir el estudio del efecto del aceite esencial sobre la línea PC12, se determina la muerte celular producida por estrés oxidativo, analizando la actividad de la principal enzima efectora de apoptosis, caspasa-3, cuyo sustrato es Ac-DEVD-AMC.

Como se observa en la **Figura 42**, la actividad enzimática de caspasa-3 se incrementa de forma muy significativa después de la exposición de las células PC12 a  $H_2O_2$  (0,1 mM) durante 30 minutos (sobre 100%) comparado con las células control. Esto sugiere la muerte celular por apoptosis en las células expuestas a  $H_2O_2$ . El pretratamiento con las muestras de aceite esencial, a las concentraciones ensayadas 50 y 15  $\mu\text{g/ml}$ , durante 24 horas atenúa el aumento de la actividad caspasa-3 en células PC12 de forma estadísticamente significativa, sugiriendo estos resultados que el aceite esencial de *S. lavandulifolia* presenta un marcado efecto anti-apoptótico (**Figura 42**).



**Figura 42. Efecto del aceite esencial de *S. lavandulifolia* sobre la actividad caspasa-3.** Las células PC12 se tratan con las muestras de aceite esencial a las concentraciones 50 y 15  $\mu\text{g/ml}$  durante 24 horas y se incuban con  $H_2O_2$  (0,1 mM) durante 30 minutos. La actividad caspasa-3 se determina en extractos celulares totales mediante medida en un fluorímetro, utilizando el sustrato específico Ac-DEVD-AMC. Los resultados se representan como % respecto al control (100%, células sin tratar). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \* $p < 0,05$  vs control y # $p < 0,05$  vs  $H_2O_2$ .



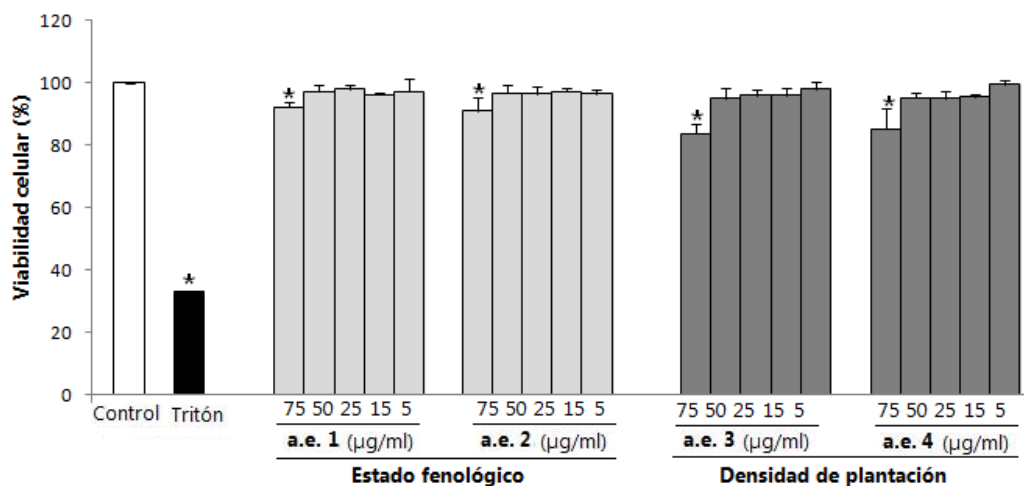
### 1.2.3. Actividad citoprotectora sobre la línea celular U373-MG en modelo de estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Una vez estudiado el efecto protector del aceite esencial de *S. lavandulifolia* en células PC12 (modelo neuronal) se procede a estudiar el efecto de estas mismas muestras sobre astrocitos (células mayoritarias del SNC), línea celular U373-MG.

#### 1.2.3.1. CITOTOXIDAD CELULAR

Para evaluar si el aceite esencial de *S. lavandulifolia* presenta toxicidad sobre células U373-MG se evalúa el porcentaje de viabilidad celular *in vitro* mediante el ensayo de MTT, a fin de determinar las concentraciones óptimas que utilizaremos en estudios posteriores.

Las células U373-MG se tratan con las muestras de aceite esencial de *S. lavandulifolia* en un amplio rango de concentraciones (75, 50, 25, 15 y 5 µg/ml) durante 24 horas a 37°C y se estudia el efecto sobre la viabilidad de las células mediante el ensayo de reducción del MTT. Como control negativo se usa Tritón X-100.

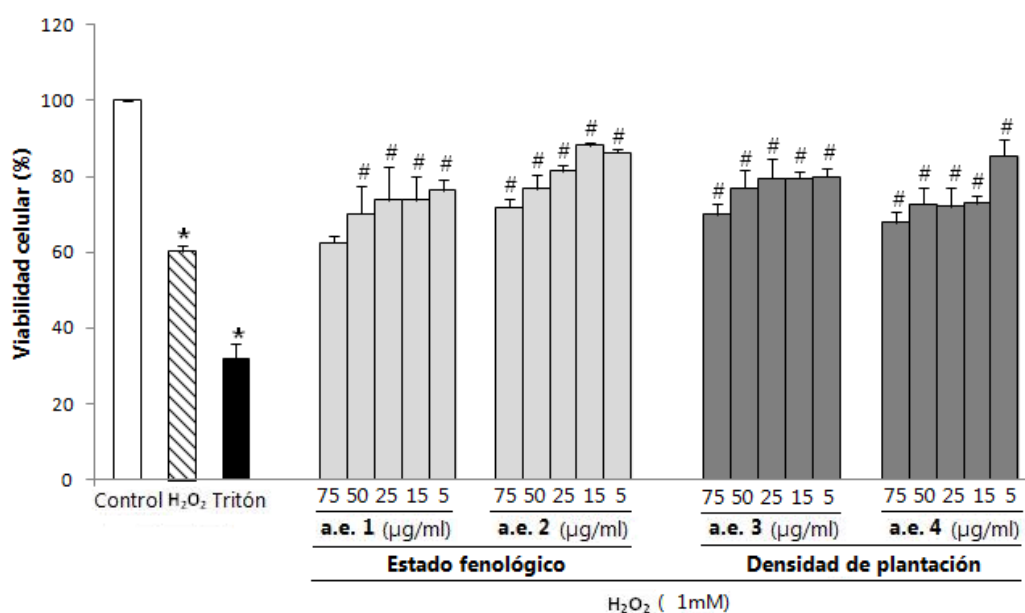


**Figura 43. Evaluación *in vitro* de los efectos del aceite esencial de *S. lavandulifolia* (a.e. 1, a.e. 2, a.e. 3 y a.e. 4) sobre la viabilidad celular.** Las células U373-MG se incuban con las muestras de aceite esencial a distintas concentraciones (75-5 µg/ml) durante 24 horas. El porcentaje de células viables se determina mediante el ensayo de MTT. Como control positivo se utilizan células sin tratar y como control negativo células tratadas con Tritón X-100. Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad celular, considerándose el 100% los valores obtenidos para las células no tratadas. Los datos se expresan como media ± SD (n=3). \* $p < 0,05$ , vs control.

### 1.2.3.2. EFECTO PROTECTOR FRENTE A LA TOXICIDAD INDUCIDA POR H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

A continuación, tras establecer las concentraciones no citotóxicas, se ha determinado el efecto citoprotector *in vitro* de los aceites esenciales en un modelo de estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre las células U373-MG por el método de MTT.

Con este fin, la línea celular se trata con las muestras de aceite esencial (75-5 µg/ml) durante 24 horas y posteriormente con el inductor del daño oxidativo, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM), durante 30 minutos. Como control negativo se emplea Tritón X-100.



**Figura 44. Efecto citoprotector del aceite esencial de *S. lavandulifolia* frente a la toxicidad inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Las células U373-MG se pretratan durante 24 horas con diferentes concentraciones del aceite esencial en estudio (75-5 µg/ml) y se incuban con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) durante 30 minutos. El porcentaje de células viables se determina mediante el método de reducción celular del MTT. Los datos se expresan como porcentaje de viabilidad, media ± SD (n=3). \**p*<0,05 vs control, #*p*<0,05 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Tal como se puede apreciar en la **Figura 44**, la incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causa una significativa disminución de la viabilidad celular, comparado con las células control (100%), bajo las condiciones experimentales establecidas.

El pretratamiento durante 24 horas con las muestras de aceite esencial en estudio, previo a la exposición de las células con el inductor de estrés oxidativo, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM, 30 minutos), incrementa de manera significativa la viabilidad celular comparado con las células tratadas únicamente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por tanto, presentan protección frente al daño oxidativo ocasionado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la función y estructura celular. Concretamente, **a.e. 3**, del estudio de influencia de la densidad de plantación, y especialmente **a.e. 2**, del estudio de influencia del estado fenológico, presenta un mayor efecto citoprotector de forma estadísticamente significativa.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos anteriormente, se seleccionan dos concentraciones, 50 y 15 µg/ml, que no afectan a la viabilidad celular y que presentan efecto citoprotector para proseguir con el estudio de los posibles mecanismos mediante los cuales el aceite esencial de *S. lavandulifolia* protege a las células U373-MG frente al daño oxidativo provocado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

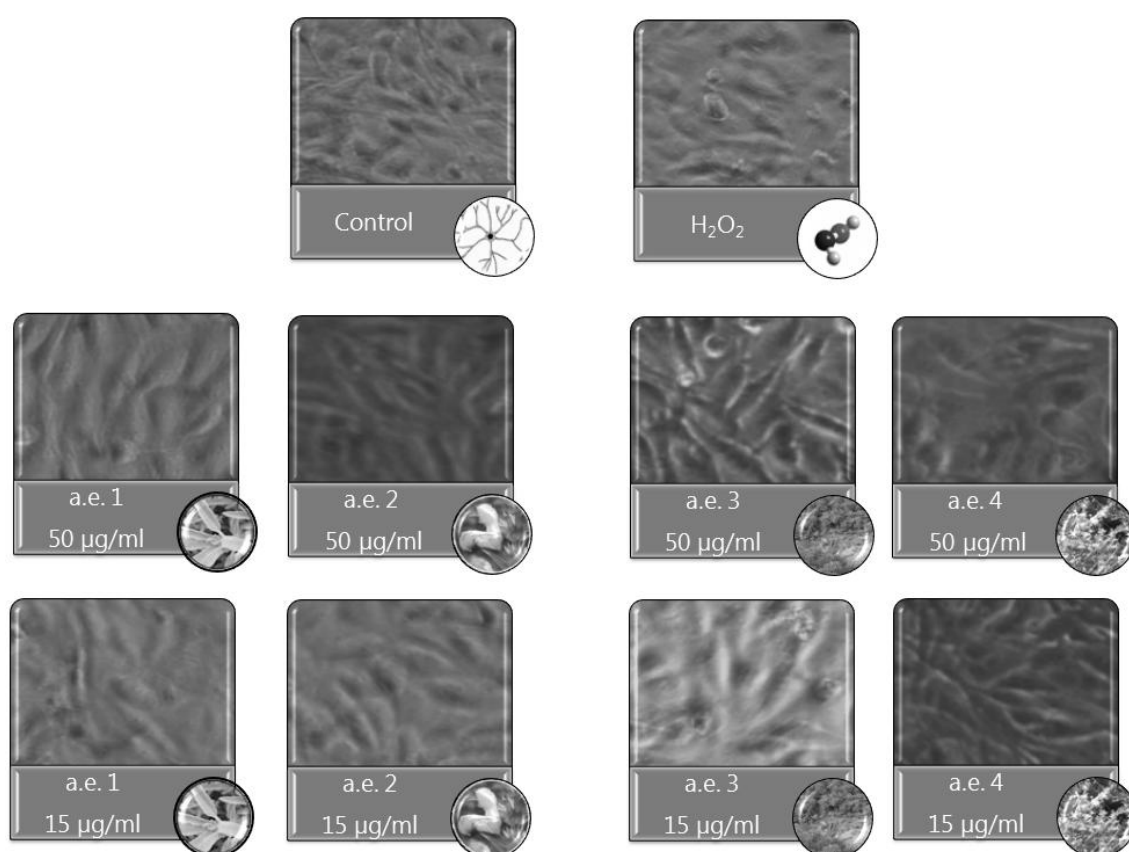
#### **1.2.3.3. EFECTO SOBRE LA MORFOLOGÍA CELULAR**

Para completar este estudio y confirmar el efecto protector del aceite esencial de *S. lavandulifolia*, se evalúa la morfología de las células U373-MG tras los tratamientos con los aceites esenciales mediante un microscopio de contraste de fase (NIKON TMS).

En la **Figura 45** se muestran las imágenes representativas del efecto de cada uno de los tratamientos sobre la morfología de las células U373-MG. Los astrocitos presentan una morfología estrellada característica. Como se puede observar en la imagen, las células control presentan prolongaciones, grandes y numerosas.

Cuando las células se tratan con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) durante 30 minutos, se producen una serie de cambios morfológicos: pierden ramificaciones, reducen su tamaño y disminuyen el número de células.

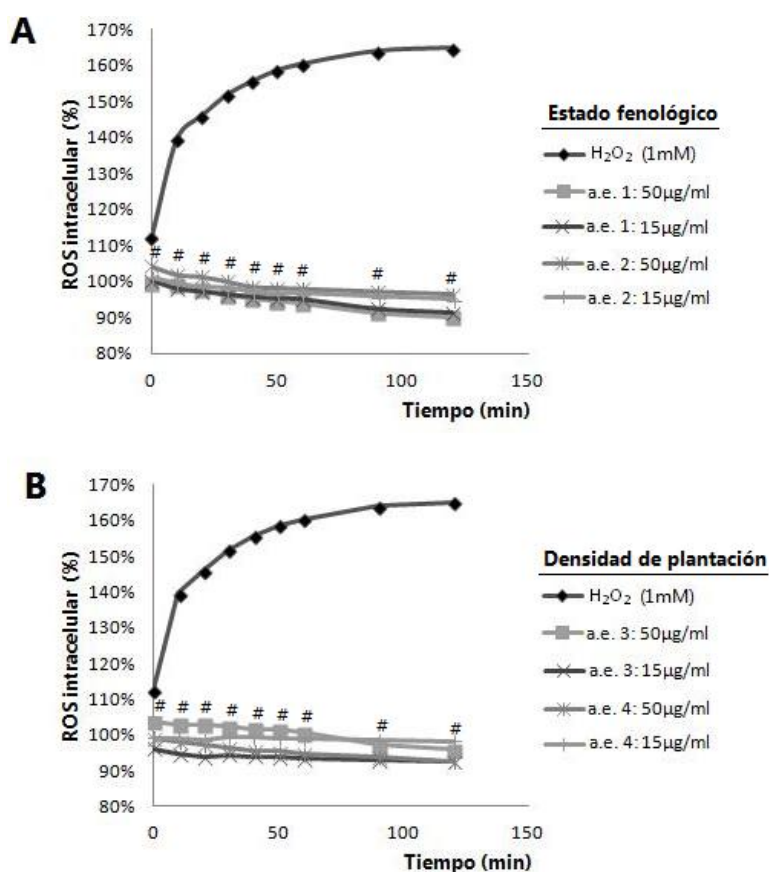
Sin embargo, el pretratamiento durante 24 horas con el aceite esencial de *S. lavandulifolia*, previo a la exposición con  $H_2O_2$ , disminuye los cambios morfológicos inducidos por el mismo, presentando las células su aspecto normal estrellado y de mayor tamaño. Así mismo se observa que no disminuye el número de células en ninguna de las muestras de aceite esencial en estudio, procedente tanto del estudio de influencia del estado fenológico como del estudio de influencia de la densidad de plantación.



**Figura 45. Morfología celular.** Efecto sobre la morfología de las células U373-MG de los diferentes tratamientos con aceite esencial de *S. lavandulifolia* (50 y 15  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 24 horas y 30 minutos de exposición a  $H_2O_2$  (1 mM); así como de las células sin tratar (control) y las células incubadas con  $H_2O_2$  únicamente. Las imágenes corresponden a fotografías representativas de cada uno de los tratamientos, tomadas utilizando una cámara Moticam acoplada a un microscopio de contraste de fase.

#### 1.2.3.4. EFECTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ROS

Como se ha comentado anteriormente, el exceso en la cantidad de ROS en nuestro organismo desencadena una situación de estrés oxidativo. Por tanto, teniendo esto en cuenta, hemos estudiado si el  $H_2O_2$ , en las condiciones experimentales establecidas, presenta capacidad generadora de ROS intracelular en células U373-MG mediante el ensayo de la diclorofluoresceína. Así mismo, hemos estudiado el efecto que producen los aceites esenciales procedentes de muestras obtenidas de plantas cultivadas en el estudio de influencia del estado fenológico y en el estudio influencia de densidad de plantación.



**Figura 46. Efecto del aceite esencial de *S. lavandulifolia* sobre la liberación de ROS intracelular.** Las células U373-MG se incuban con DCFH-DA durante 30 minutos, en oscuridad a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. A continuación, se tratan con diferentes concentraciones del aceite esencial en estudio (50 y 15 µg/ml) procedentes de plantas con diferentes estados fenológicos y se comparan con las células únicamente tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM). Los resultados se expresan como % de producción de ROS intracelulares respecto al control. Los datos se expresan como media ± SD (n=3). #*p*<0,05 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respecto al tiempo.

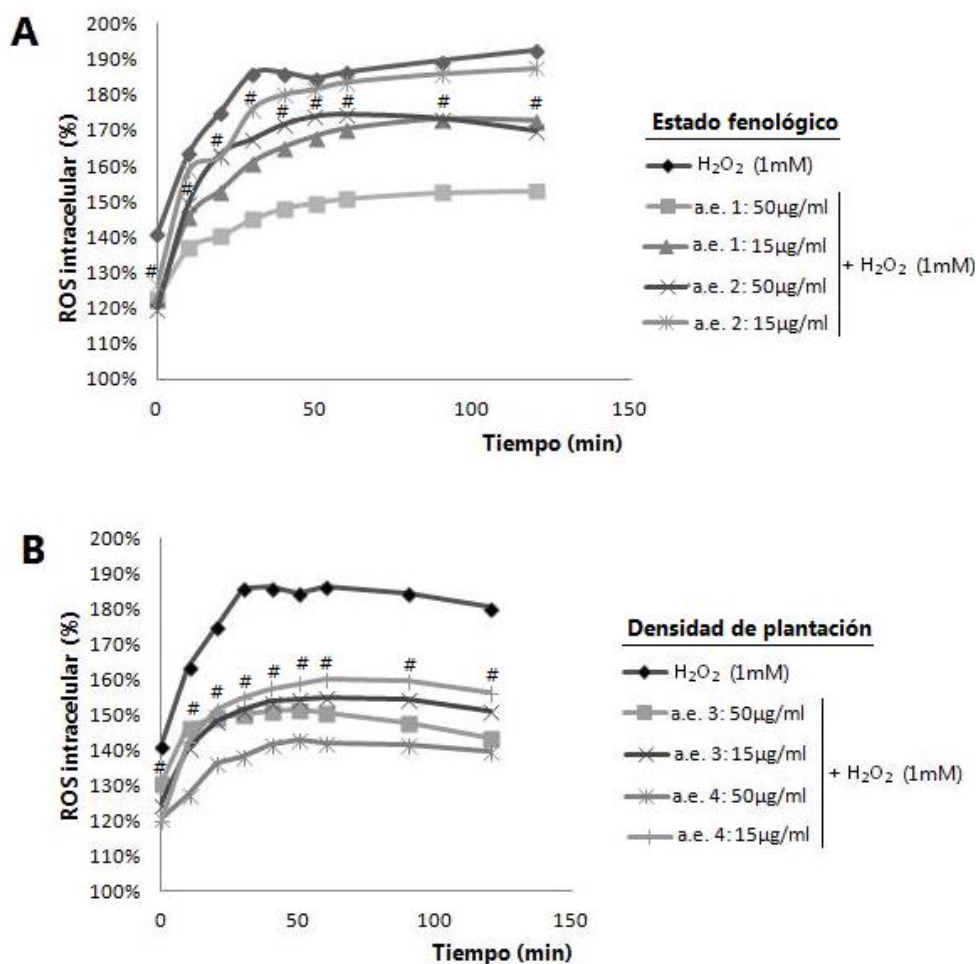
Los resultados obtenidos se presentan en la **Figura 46**, mostrando que las células U373-MG únicamente tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,1 mM) presentan mayores niveles intracelulares de ROS de manera significativa de forma tiempo-dependiente respecto al control, confirmando el efecto inductor de estrés oxidativo del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en las condiciones experimentales establecidas en el estudio. Al finalizar el ensayo la producción de ROS intracelular alcanza más del 160% en las células tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Los aceites esenciales objeto de estudio a las concentraciones ensayadas (50 y 15  $\mu\text{g/ml}$ ) no estimulan *per se* la producción de ROS intracelular, al comparar las ROS producidas en las células tratadas con los aceites esenciales y las células usadas como control. Estos resultados demuestran que los aceites esenciales en estudio no tienen capacidad oxidativa frente a la DCFH en células U373-MG.

➤ **Efecto neuroprotector frente a la citotoxicidad inducida por  $\text{H}_2\text{O}_2$**

A continuación, hemos estudiado la capacidad captadora de ROS de los aceites esenciales de *S. lavandulifolia* (50 y 15  $\mu\text{g/ml}$ ) en estudio en un modelo de estrés oxidativo inducido en comparación con las células únicamente tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Tal y como se observa en la **Figura 47**, cuando las células U373-MG son tratadas con el aceite esencial de *S. lavandulifolia* previo a la exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM) durante 30 minutos, la cantidad de ROS intracelulares generados se ve atenuada. De manera especialmente significativa en la muestra **a.e. 1** procedente del estudio de influencia del estado fenológico y en **a.e. 3** y **a.e. 4**, del estudio de influencia de la densidad de plantación a las concentraciones estudiadas. Este efecto del aceite esencial sobre la producción de ROS inducida por  $\text{H}_2\text{O}_2$  sugiere que el efecto protector de dicho aceite se debe a su capacidad para atenuar la producción de ROS.



**Figura 47. Efecto del aceite esencial de *S. lavandulifolia* sobre la formación de ROS intracelular.** Las células U373-MG se incuban con DCFH-DA durante 30 minutos, en oscuridad a 37°C y 5% de  $CO_2$ . A continuación, se tratan con las muestras de aceite esencial (50 y 15  $\mu$ g/ml) procedentes **A)** del estudio de la influencia del estado fenológico y **B)** del estudio de la influencia de la densidad de plantación y se induce un estado de estrés oxidativo con  $H_2O_2$  (1 mM). Los resultados se expresan como % de producción de ROS intracelulares respecto al control. Los datos se expresan como media  $\pm$  SD (n=3). # $p < 0,05$  vs control de células tratadas únicamente con  $H_2O_2$  respecto al tiempo.

#### 1.2.3.5. EFECTO SOBRE LOS NIVELES DE GSH Y GSSG

La resistencia que presentan algunas células a la toxicidad está relacionada con un incremento intracelular del contenido de GSH, principal antioxidante endógeno no enzimático del organismo, mientras que un descenso de dichos niveles puede tener el efecto contrario, pudiendo producir un daño oxidativo a nivel celular. Por esta razón, se

llevan a cabo la determinación de los niveles de GSSG y GSH en células U373-MG sometidas a tratamiento con las diferentes muestras de aceite esencial de *S. lavandulifolia*, mediante fluorescencia.

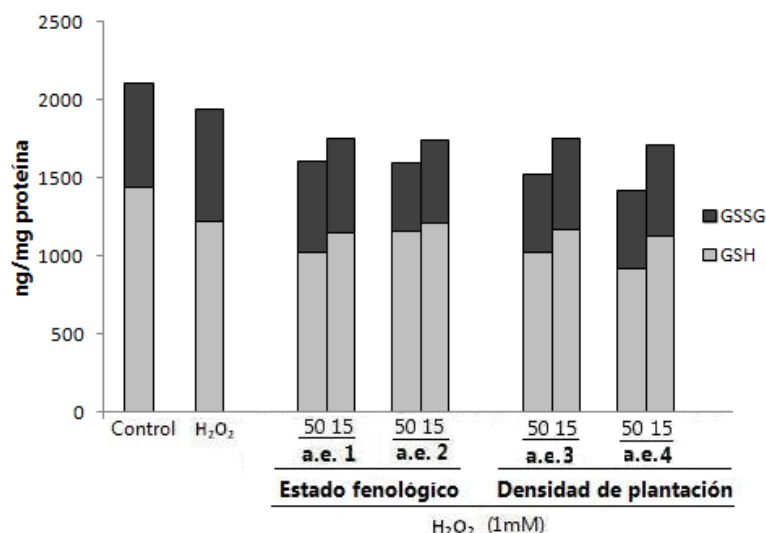
En la **Tabla 15** se representa el índice redox (IR) y en la **Figura 48** se observan los niveles de GSSG y GSH, determinados en células U373-MG pretratadas con los aceites esenciales en estudio (50 y 15 µg/ml) durante 24 horas y expuestos a un estado de estrés oxidativo inducido con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) durante 30 minutos.

Se observa un aumento del IR en las células únicamente incubadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Tabla 15**), que presenta el mayor índice redox (IR=0,37) respecto a las células control (IR=0,32). Sin embargo, cuando las células se incuban con los aceites esenciales en estudio previamente, el IR disminuye respecto a las células tratadas sólo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Observándose mejores resultados para **a.e. 2** del estudio de influencia del estado de floración y correspondiente a la planta en plena floración.

IR=GSSG/(GSSG+GSH)	
<b>Control</b>	0,32 ±0,03
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM)</b>	0,37 ±0,05
<b>a.e. 1 (50µg/ml)</b>	0,34 ±0,05
<b>a.e. 1 (15µg/ml)</b>	0,34 ±0,06
<b>a.e. 2 (50µg/ml)</b>	0,27 ±0,03
<b>a.e. 2 (15µg/ml)</b>	0,31 ±0,08
<b>a.e. 3 (50µg/ml)</b>	0,33 ±0,07
<b>a.e. 3 (15µg/ml)</b>	0,34 ±0,06
<b>a.e. 4 (50µg/ml)</b>	0,34 ±0,07
<b>a.e. 4 (15µg/ml)</b>	0,35 ±0,10

**Tabla 15. Efecto del aceite esencial de *S. lavandulifolia* sobre los niveles de glutatión.** Las células U373-MG son pretratadas con los aceites esenciales en estudio (50 y 15 µg/ml) durante 24 horas e incubadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) durante 30 minutos. El efecto del aceite esencial sobre la cantidad de glutatión se determina mediante fluorescencia por triplicado utilizando el OPT como marcador de fluorescencia. Los datos se expresan como media ± SD (n=3). No se encuentran diferencias estadísticamente significativas al realizar el análisis de ANOVA, con relación a la variable de las células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.





**Figura 48. Relación GSSG-GSH.** Las células U373-MG se pretratan con el aceite esencial de *S. lavandulifolia* (50 y 15 µg/ml) durante 24 horas y, a continuación, se incuban durante 30 minutos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM). Los datos se expresan como media ± SD (n= 3).

En la **Figura 48** se muestra la relación entre los niveles de GSH y GSSG en cada una de las muestras en estudio. Al incubar las células con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> los niveles de GSH disminuyen respecto al control, mientras que los niveles de GSSG aumentan. Las células control, así como las células tratadas con las muestras de aceite esencial en estudio presentan mayoritariamente glutatión en su estado reducido (GSH).

#### 1.2.3.6. EFECTO SOBRE EL SISTEMA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO

Una vez evaluado el efecto protector del aceite esencial de *S. lavandulifolia* frente al daño oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se ha determinado si esta capacidad citoprotectora puede ser debida a la activación del sistema antioxidante enzimático celular durante el proceso de estrés oxidativo en la línea celular U373-MG. Para ello, evaluamos el efecto de las muestras de aceite esencial sobre la actividad de las principales enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPx, GR y HO-1) en las células expuestas a daño oxidativo mediado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se analiza en primer lugar la actividad de estas enzimas de forma espectrofotométrica y a continuación su expresión proteica mediante la técnica de Western Blot.

Para la determinación de los niveles de enzimas antioxidantes, las células U373-MG se pretratan durante 24 horas con las muestras de aceite esencial en estudio y se induce un estado de estrés oxidativo por  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM) durante 30 minutos. La determinación de los niveles de enzimas antioxidantes se evalúa analizando los extractos totales de las células U373-MG tratadas.

El tratamiento de las células con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM) induce una disminución significativa de los niveles de enzimas antioxidantes, en la mayoría de los casos, de forma estadísticamente significativa en comparación con las células control. Sin embargo, el pretratamiento de las células con las dos concentraciones (50 y 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) de aceite esencial inhibe de forma significativa el incremento de los niveles de estrés oxidativo causado por  $\text{H}_2\text{O}_2$  a través de la inducción de los sistemas de protección antioxidante frente al estrés oxidativo.

Concretamente, se demuestra de este modo (**Figura 49**) que cuando las células son tratadas sólo con  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 30 minutos se produce una disminución significativa de la actividad y expresión de catalasa (**CAT**) en comparación con las células control. Mientras que el tratamiento de las células U373 MG con los aceites esenciales (50 y 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) incrementa, de forma significativa, la expresión de esta enzima antioxidante atenuando el efecto dañino del  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM). Concretamente, se observa que **a.e. 3**, correspondiente a la muestra de aceite esencial obtenida de plantas cultivadas en el estudio de influencia de la densidad de plantación y con menor distancia entre las líneas de las plantas, presenta mayor actividad antioxidante de forma estadísticamente significativa frente a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (34,1 UI/mg proteína).

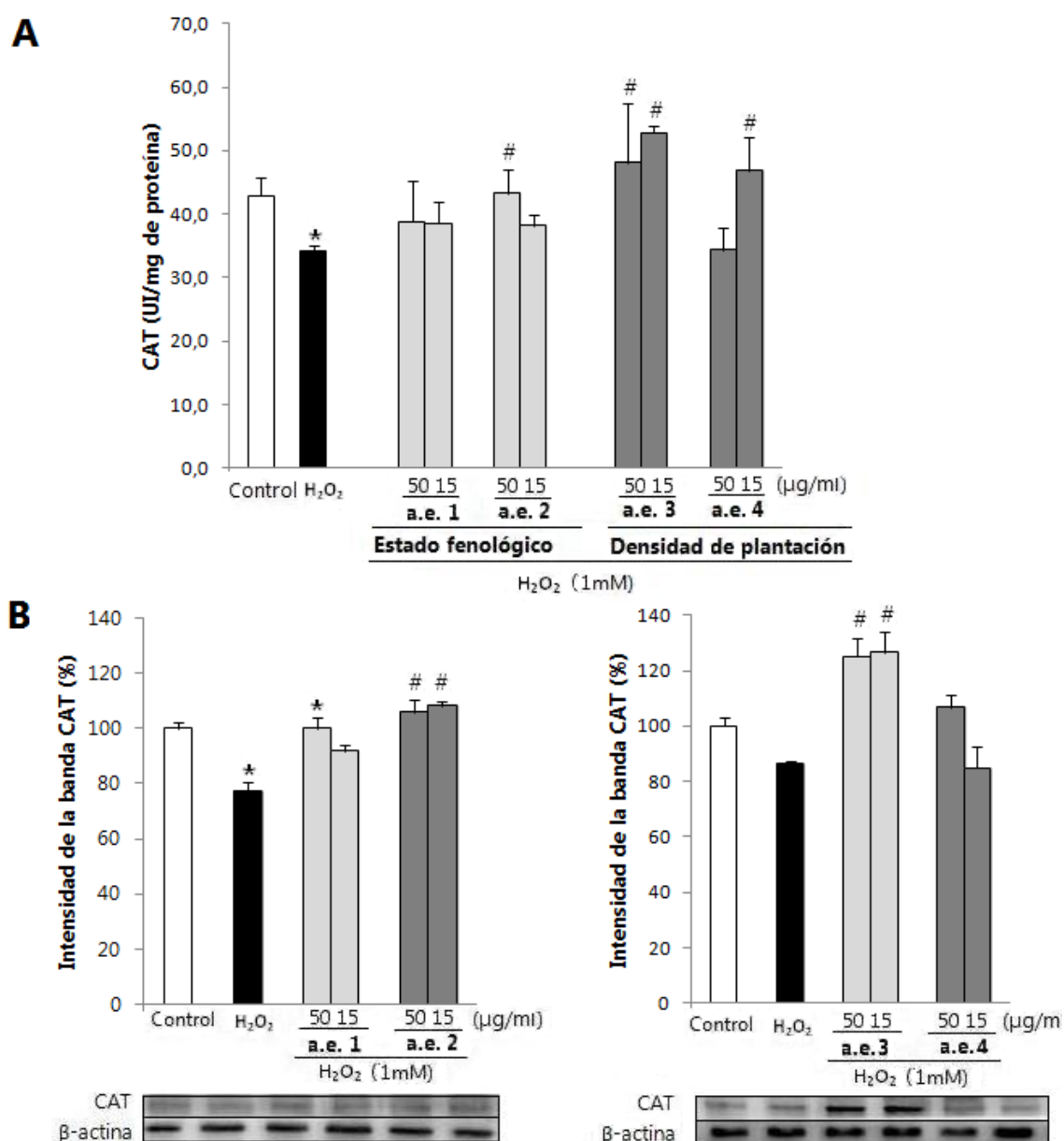
Como se aprecia en la **Figura 50**, al tratar las células U373-MG con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM) se produce una disminución significativa en la actividad y en la expresión de superóxido dismutasa (**SOD**) respecto a las células control. Sin embargo, se observa un aumento estadísticamente significativo de la expresión proteica de las células tratadas con las muestras de aceite esencial, respecto a las células tratadas sólo con  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Los resultados de la actividad y la expresión de glutatión peroxidasa (**GPx**) muestran en la **Figura 51** que sus valores disminuyen en las células U373-MG tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) durante 30 minutos. Sin embargo el tratamiento durante 24 horas con el aceite esencial previo a la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aumenta la actividad y la expresión de GPx en comparación con las células expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, especialmente en **a.e. 1.** y **a.e. 2.**

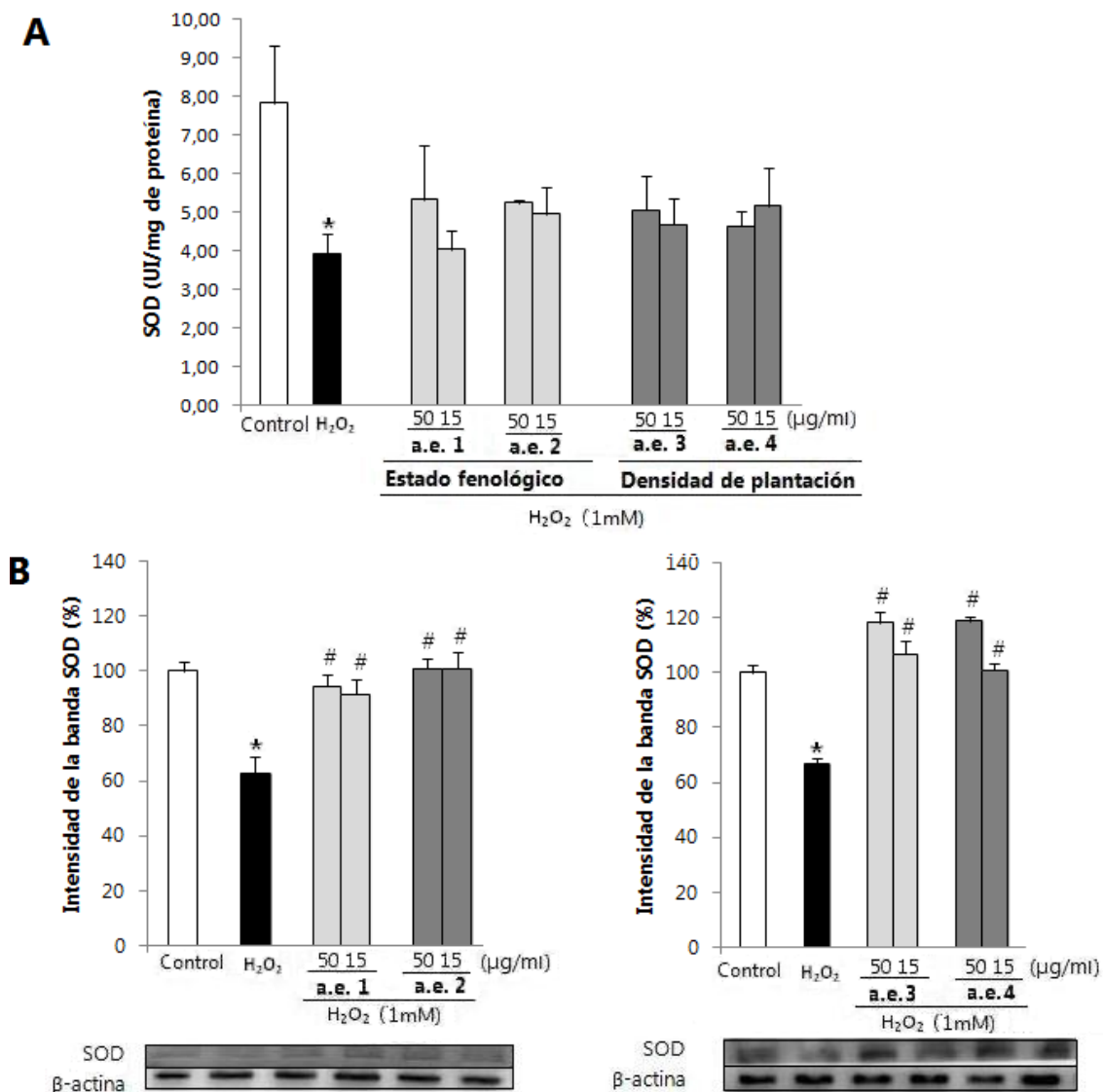
En relación al estudio de actividad de glutatión reductasa (**GR**), los resultados muestran una menor actividad y la expresión en células U373-MG tratadas solamente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en comparación con la actividad y expresión en células pretratadas con las muestras de aceite esencial durante 24 horas previamente a la exposición con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En la **Figura 52** se observa un aumento significativo de la actividad enzimática de GR, en las muestras **a.e. 1.** y especialmente en **a.e. 2** y **a.e. 3**, a ambas concentraciones, mostrando un efecto protector.

Finalmente, en la **Figura 53** se muestran los resultados de la actividad y expresión de proteínas de hemo-oxigenasa 1 (**HO-1**). Se observa que la actividad disminuye en las células únicamente incubadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respecto a las células tratadas con aceite esencial, en donde se observa un aumento de la actividad enzimática, especialmente en las muestras **a.e. 1., a.e. 2** y **a.e. 3** al igual que ocurría en PC12 y un ligero aumento de la expresión proteica.

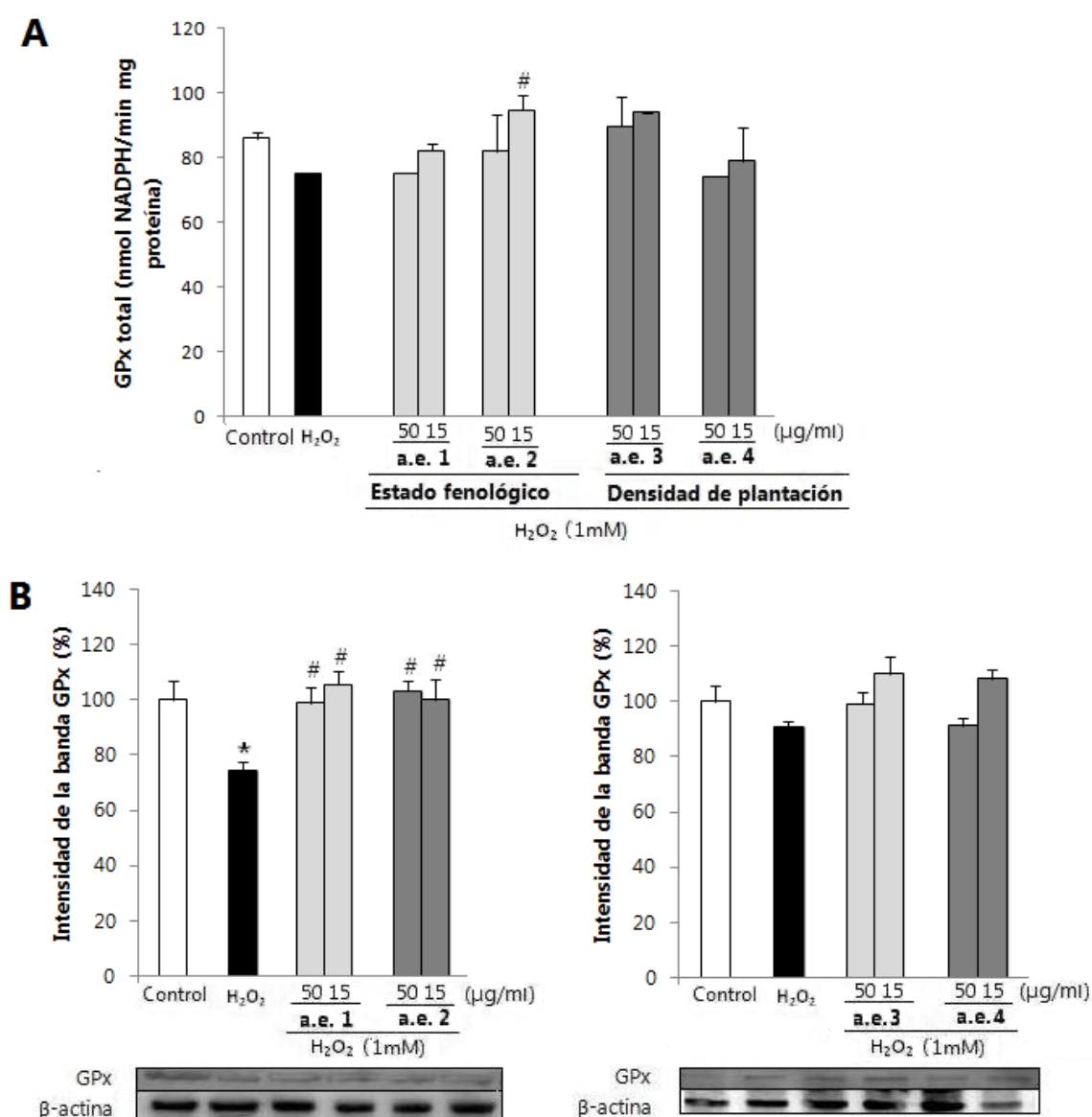
Los resultados de la actividad y la expresión de proteínas de las enzimas antioxidantes CAT, SOD, GPx, GR y HO-1 demuestran una importante actividad protectora del aceite esencial de *S. lavandulifolia* en células U373-MG contra el estrés oxidativo. Estos efectos, son concordantes con los observados en células PC12.



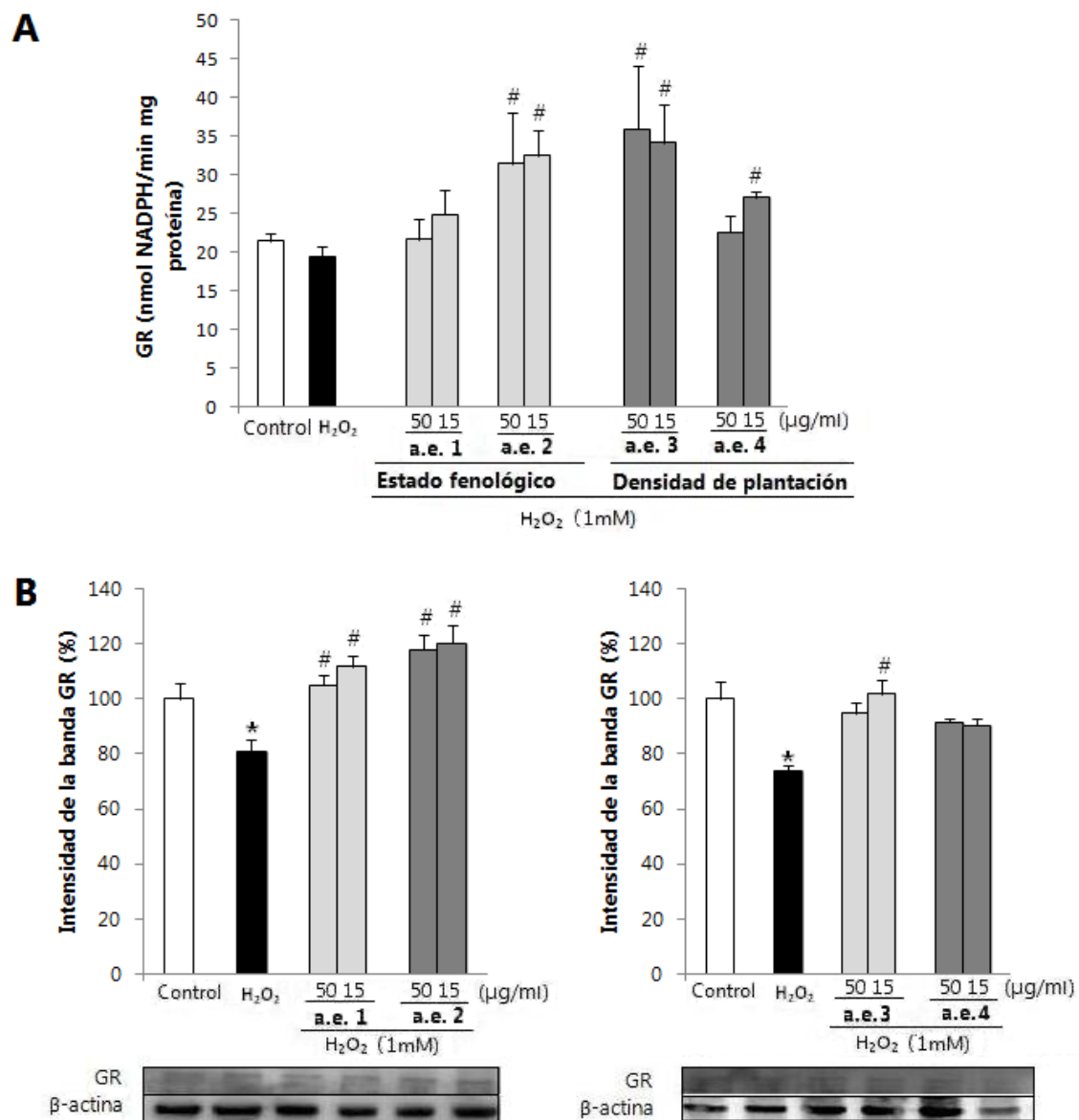
**Figura 49. Efecto del aceite esencial de *S. lavandulifolia* en la actividad y expresión enzimática de CAT.** Las células U373-MG se preincubaban con las muestras de aceite esencial (50 y 15 µg/ml) durante 24 horas y posteriormente se induce un estado de estrés oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) durante 30 minutos. **A)** La actividad enzimática de CAT se mide mediante espectrofotometría en extractos celulares totales. Los resultados de la actividad enzimática se expresan como UI/mg proteína. **B)** La expresión de proteínas se determinan por Western Blot en extractos celulares totales. Los resultados de la expresión de proteínas se representan como % de intensidad de banda respecto al control, que se considera 100%. Se utiliza la β-actina como normalizador de carga. En la parte inferior de la figura se representa el análisis densitométrico de una membrana representativa. Los resultados se expresan como media ± SD (n=3). \**p*<0,05 vs control y #*p*<0,05 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



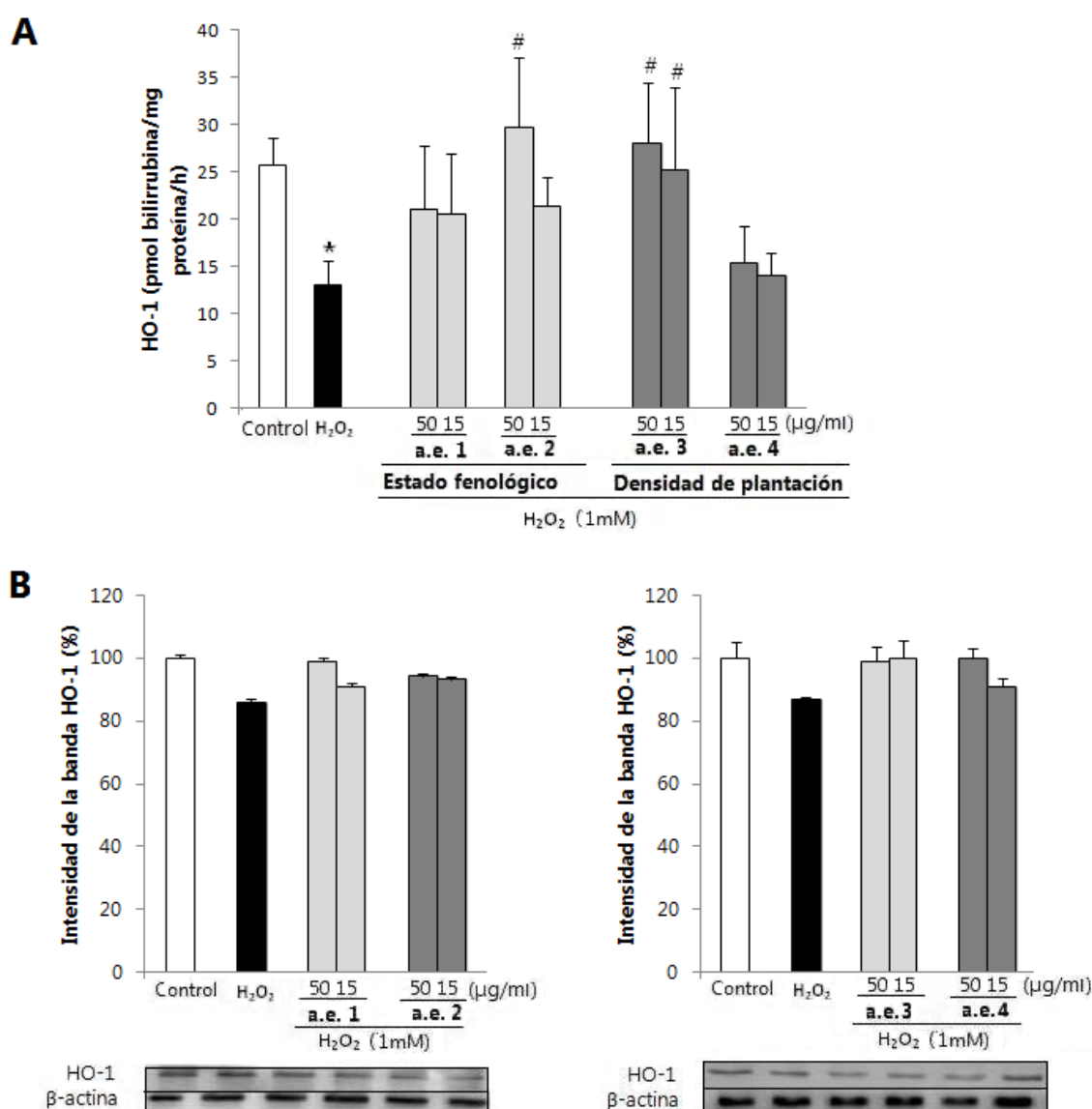
**Figura 50. Efecto del aceite esencial de *S. lavandulifolia* en la actividad y expresión enzimática de SOD.** Las células U373-MG se preincubaban con las muestras de aceite esencial (50 y 15  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 24 horas y posteriormente se induce un estado de estrés oxidativo con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM) durante 30 minutos. **A)** La actividad enzimática de SOD se mide mediante espectrofotometría en extractos celulares totales. Los resultados de la actividad enzimática se expresan como UI/mg proteína. **B)** La expresión de proteínas se determinan por Western Blot en extractos celulares totales. Los resultados de la expresión de proteínas se representan como % de intensidad de banda respecto al control, que se considera 100%. Se utiliza la  $\beta$ -actina como normalizador de carga. En la parte inferior de la figura se representa el análisis densitométrico de una membrana representativa. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SD ( $n=3$ ). \* $p<0,05$  vs control y # $p<0,05$  vs  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



**Figura 51. Efecto del aceite esencial de *S. lavandulifolia* en la actividad y expresión enzimática de GPx.** Las células U373-MG se preincubaban con las muestras de aceite esencial (50 y 15 µg/ml) durante 24 horas y posteriormente se induce un estado de estrés oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) durante 30 minutos. **A)** La actividad enzimática de GPx se mide mediante espectrofotometría en extractos celulares totales. Los resultados de la actividad enzimática se expresan como nmol NADPH/min mg proteína. **B)** La expresión de proteínas se determinan por Western Blot en extractos celulares totales. Los resultados de la expresión de proteínas se representan como % de intensidad de banda respecto al control, que se considera 100%. Se utiliza la β-actina como normalizador de carga. En la parte inferior de la figura se representa el análisis densitométrico de una membrana representativa. Los resultados se expresan como media ± SD (n=3). \**p*<0,05 vs control y #*p*<0,05 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Figura 52. Efecto del aceite esencial de *S. lavandulifolia* en la actividad y expresión enzimática de GR.** Las células U373-MG se preincubaban con las muestras de aceite esencial (50 y 15  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 24 horas y posteriormente se induce un estado de estrés oxidativo con  $H_2O_2$  (1 mM) durante 30 minutos. **A)** La actividad enzimática de GR se mide mediante espectrofotometría en extractos celulares totales. Los resultados de la actividad enzimática se expresan como nmol NADPH/min mg proteína. **B)** La expresión de proteínas se determinan por Western Blot en extractos celulares totales. Los resultados de la expresión de proteínas se representan como % de intensidad de banda respecto al control, que se considera 100%. Se utiliza la  $\beta$ -actina como normalizador de carga. En la parte inferior de la figura se representa el análisis densitométrico de una membrana representativa. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SD (n=3). \* $p < 0,05$  vs control y # $p < 0,05$  vs  $H_2O_2$ .

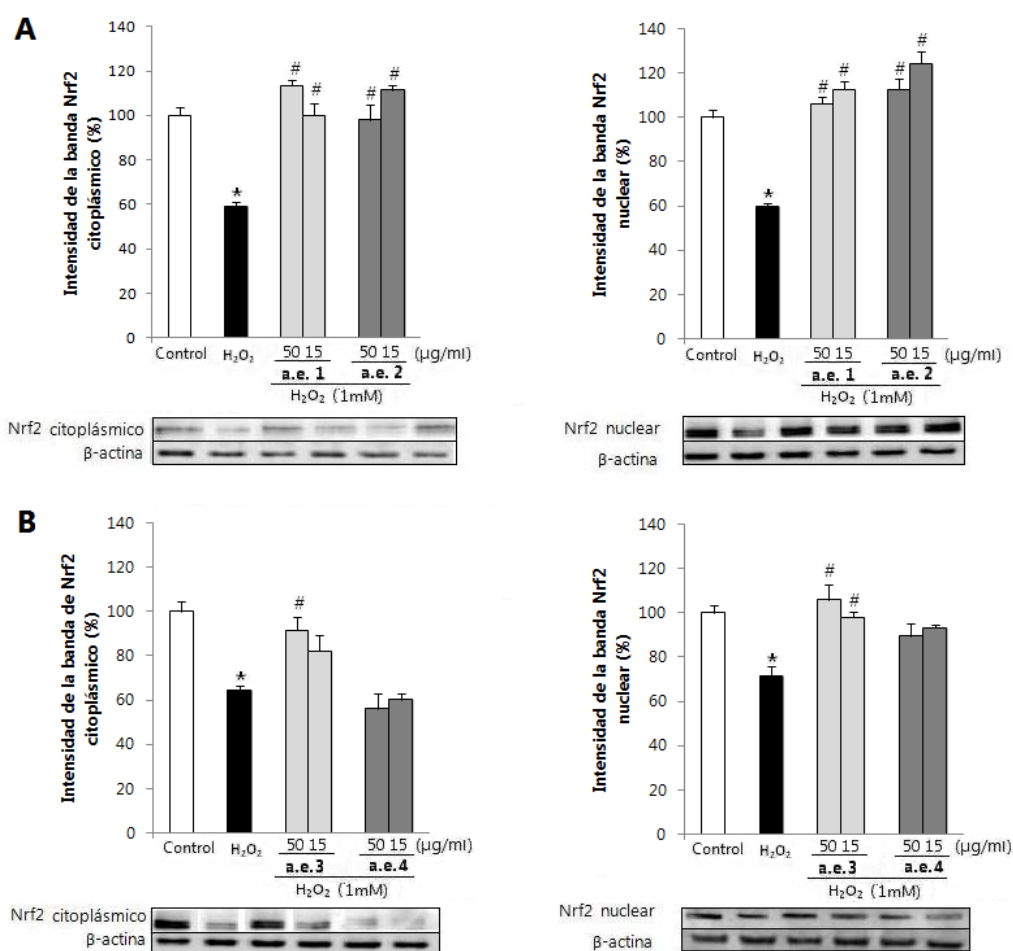


**Figura 53. Efecto del aceite esencial de *S. lavandulifolia* en la actividad y expresión enzimática de HO-1.** Las células U373-MG se preincubaban con las muestras de aceite esencial (50 y 15  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 24 horas y posteriormente se induce un estado de estrés oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) durante 30 minutos. **A)** La actividad enzimática de HO-1 se mide mediante espectrofotometría en extractos celulares totales. Los resultados de la actividad enzimática se expresan como pmol bilirubina /mg proteína/h. **B)** La expresión de proteínas se determinan por Western Blot en extractos celulares totales. Los resultados de la expresión de proteínas se representan como % de intensidad de banda respecto al control, que se considera 100%. Se utiliza la  $\beta$ -actina como normalizador de carga. En la parte inferior de la figura se representa el análisis densitométrico de una membrana representativa. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SD (n=3). \* $p < 0,05$  vs control y # $p < 0,05$  vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



### 1.2.3.7. EFECTO SOBRE LA VÍA NRF2

Para completar el ensayo, se evalúa el efecto del aceite esencial de *S. lavandulifolia* sobre la expresión del factor Nrf2, con el fin de comprobar si la inducción de las enzimas antioxidantes observada se produce a través de la activación de esta vía Nrf2 en células U373-MG. Se evalúan mediante Western Blot los niveles citosólicos y nucleares (**Figura 54**) de la proteína Nrf2.



**Figura 54. Efecto del aceite esencial de *S. lavandulifolia* sobre la expresión de Nrf2 citoplásmico y nuclear.** Las células U373-MG se preincubaban con las muestras de aceite esencial (50 y 15 µg/ml) durante 24 horas procedentes **A)** del estudio de la influencia del estado fenológico y **B)** del estudio de la influencia de la densidad de plantación y se induce un estado de estrés oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) durante 30 minutos. Los niveles de Nrf2 citoplásmico y nuclear se determinan por Western Blot a partir de extractos citosólicos y nucleares, respectivamente, de células U373-MG. Se utiliza la proteína β-actina como normalizador de carga. En la parte inferior de la figura se representa el análisis densitométrico. La imagen muestra un experimento representativo de tres. Los datos se expresan como media ± SD (n= 3) y se representa como % de intensidad de banda respecto al control que se considera 100%. \**p*<0,05 vs control y #*p*<0,05 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, control de células sin tratamiento con aceite esencial.

Se preparan extractos citosólicos y nucleares, tras el pretratamiento de las células U373-MG con las muestras de aceite esencial (50 y 15 µg/ml) durante 24 horas y la exposición al inductor de estrés oxidativo, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM), durante 30 minutos.

Como se muestra en la **Figura 54**, las células incubadas sólo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentan una menor inducción de la vía Nrf2. Mientras, el pretratamiento con los aceites esenciales durante 24 horas inducen la expresión de la proteína citoplásmica y nuclear Nrf2 en células U373-MG de manera estadísticamente significativa. Especialmente, al igual que en otros casos, destacan las muestras **a.e. 1**, **a.e. 2** y **a.e. 3**. Estos resultados indican que la actividad protectora del aceite esencial se debe a la activación de las enzimas antioxidantes mediante la vía Nrf2 y la consiguiente activación de los genes relacionados con las enzimas antioxidantes.

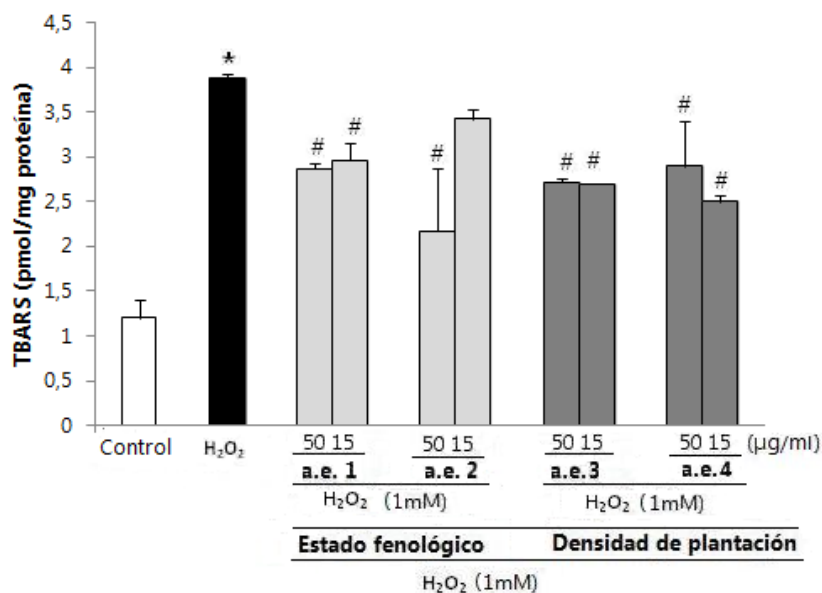
#### **1.2.3.8. EFECTO SOBRE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA**

La peroxidación lipídica se utiliza como marcador del estrés oxidativo producido en las células. Mediante la medida de los niveles de TBARS se mide la degradación oxidativa de lípidos y determinamos así la capacidad del aceite esencial para inhibir la peroxidación lipídica.

Tal y como se muestra en la **Figura 55**, en las células expuestas a condiciones de estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) durante 30 minutos (3,9 pmol/mg proteína), se produce un aumento significativo de la concentración TBARS respecto a las células control (1,2 pmol/mg proteína).

Sin embargo, el pretratamiento de las células U373-MG con las muestras de aceite esencial durante 24 horas da lugar a la reducción de la formación de los subproductos de la peroxidación lipídica en las condiciones de estrés oxidativo inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esto indica que ninguna de las muestras de aceite esencial produce

la degradación biológica de las membranas por peroxidación lipídica. Esta reducción de la peroxidación lipídica es significativa para todas las muestras ensayadas.

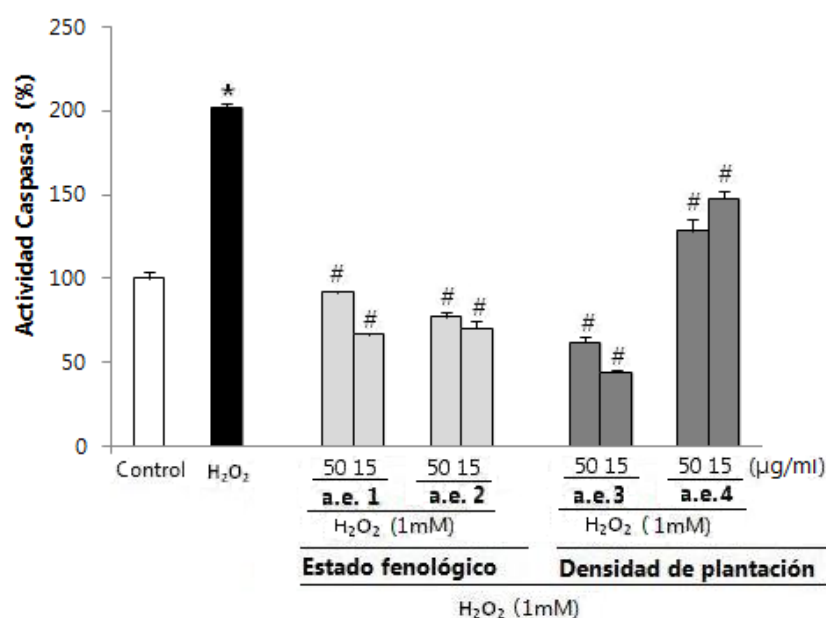


**Figura 55. Efecto del aceite esencial de *S. lavandulifolia* sobre la peroxidación lipídica.** Las células U373-MG se tratan con las muestras de aceite esencial (50 y 15 µg/ml) durante 24 horas y se incuban con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) durante 30 minutos. Los resultados se expresan como pmol/mg proteína, media ± SD (n=3). \**p*<0,05 vs control y #*p*<0,05 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 1.2.3.9. EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD DE CASPASA-3

Con el fin de profundizar en el estudio del efecto del aceite esencial, nos planteamos evaluar su efecto en el proceso de apoptosis, determinando la actividad caspasa-3, que puede ser activada por mecanismos de estrés oxidativo.

Se evalúa si las muestras de aceite esencial (50 y 15 µg/ml) protegen a los astrocitos de la apoptosis inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para ello, se realizan estudios, con el fin de determinar el porcentaje de células apoptóticas mediante fluorimetría, utilizando como sustrato Ac-DEVD-AMC.



**Figura 56. Efecto del aceite esencial de *S. lavandulifolia* sobre la actividad caspasa-3.** Las células U373-MG se tratan con las muestras de aceite esencial a las concentraciones 50 y 15 µg/ml durante 24 horas y se incuban con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) durante 30 minutos. La actividad caspasa-3 se determina en extractos celulares totales mediante medida en un fluorímetro, utilizando el sustrato específico Ac-DEVD-AMC. Los resultados se representan como % respecto al control (100%, células sin tratar). Los resultados se expresan como media ± SD (n= 3). \* $p < 0,05$  vs control y # $p < 0,05$  vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Los resultados expuestos en la **Figura 56** muestran que la incubación de las células U373 MG con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) durante 30 minutos produce un aumento rápido de la apoptosis al liberarse la caspasa-3, del doble respecto a las células control, cuantificado por el incremento del porcentaje de fluorescencia.

La preincubación de las células durante 24 horas con las muestras de aceite esencial a las concentraciones ensayadas previo a la exposición al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reduce significativamente la fluorescencia y por tanto la actividad caspasa-3, observándose por tanto, un efecto protector bajo las condiciones experimentales establecidas. La fluorescencia en células no tratadas con los aceites esenciales (control) se considera el 100% de actividad caspasa-3. Destacan una vez más las muestras de aceite esencial **a.e.1.** y **a.e. 2** procedentes de muestras obtenidas de plantas cultivadas en el estudio de influencia del estado fenológico y **a.e. 3** en el estudio de influencia de la densidad de plantación y con menor distancia entre líneas de las plantas.

## 2. ESTUDIO DE LOS MONOTERPENOS AISLADOS: $\alpha$ -PINENO, 1,8-CINEOL Y ALCANFOR

### 2.1. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA

#### 2.1.1. Capacidad antioxidante

La capacidad de absorber radicales de los monoterpenos mayoritarios del aceite esencial de *S. lavandulifolia* ( **$\alpha$ -pineno**, **1,8-cineol** y **alcanfor**) en estudio se evalúa mediante el ensayo ORAC. Los valores ORAC (expresados como  $\mu\text{mol Trolox/mg}$  compuesto) se calculan tomando como referencia el Trolox (Curva de calibración del Trolox en *Resultados: Figura 28*).

Como se puede observar en la **Tabla 16**, el **1,8-cineol** posee la mayor capacidad antioxidante al presentar el mayor valor ORAC: 0,045  $\mu\text{mol Equivalente de Trolox/mg}$ ; frente al  **$\alpha$ -pineno** con un valor ORAC 0,030  $\mu\text{mol Equivalente de Trolox/mg}$ . Sin embargo, el **alcanfor** presenta un valor de ORAC mucho menor 0,012  $\mu\text{mol Equivalente de Trolox/mg}$ .

Compuestos	Valor ORAC ( $\mu\text{mol Trolox/mg}$ )
$\alpha$ -pineno	0,030 $\pm$ 0,003
1,8-cineol	0,045 $\pm$ 0,003
alcanfor	0,012 $\pm$ 0,001

**Tabla 16. Evaluación de la capacidad de captación de radicales de oxígeno por el método ORAC de las muestras de los monoterpenos en estudio.** Valor ORAC para alcanfor, 1,8-cineol y  $\alpha$ -pineno. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SD (n=3).

Los resultados muestran que  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol** reducen el nivel de radicales hidroxilo generados por la especie inductora de estrés oxidativo. Por tanto, se continúa el estudio de la actividad neuroprotectora con estos dos monoterpenos al demostrar una mayor capacidad antioxidante.

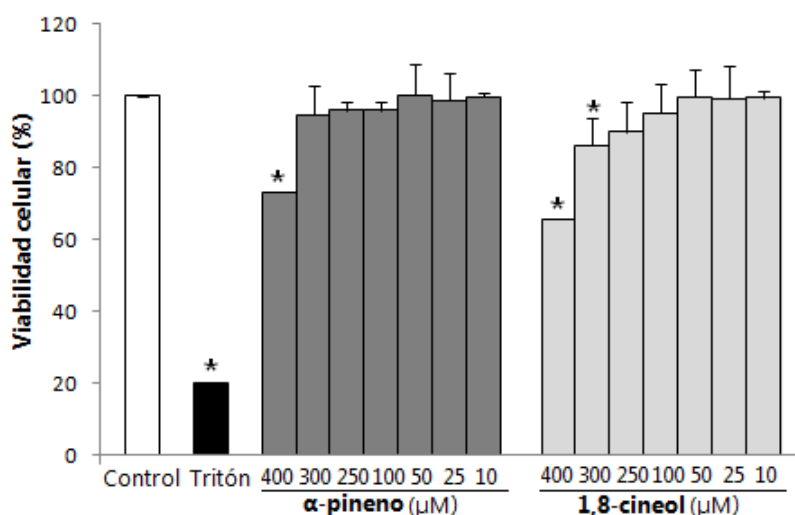
## 2.1.2. Actividad neuroprotectora sobre línea celular PC12 en modelo de estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### 2.1.2.1. CITOTOXICIDAD CELULAR

Se evalúa *in vitro* la posible toxicidad de los monoterpenos del aceite esencial de *S. lavandulifolia*:  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol**. Para ello se determina su efecto en la viabilidad de células PC12 mediante el método MTT, determinando así las concentraciones óptimas para estudios posteriores.

Para este fin, las células PC12 se tratan con los monoterpenos objeto de estudio en un amplio rango de concentraciones (400-10  $\mu$ M), durante 24 horas a 37°C. A continuación, se incuban con MTT durante 1 hora en oscuridad a 37°C. Como control positivo se utilizan células PC12 sin tratar y como control negativo se usa Tritón X-100.

A continuación, en la **Figura 57**, se presentan los resultados de resultados de viabilidad celular de  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol**.



**Figura 57. Evaluación *in vitro* del efecto  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol sobre la viabilidad celular.**

Las células PC12 se incuban con los monoterpenos a distintas concentraciones (400-10  $\mu$ M) durante 24 horas. El porcentaje de células viables se determina mediante la técnica de MTT. Como control positivo se utilizan células sin tratar y como control negativo células tratadas con Tritón X-100. Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad celular, considerándose 100% de viabilidad los valores obtenidos para las células no tratadas. Datos expresados como media  $\pm$  SD (n=3). \* $p$ <0,05 vs control.

Como se puede observar (**Figura 57**), el tratamiento con  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol** a concentraciones bajas no produce efectos citotóxicos, mientras que a concentraciones mayores disminuye el porcentaje de viabilidad celular de forma concentración-dependiente en comparación con el control (100% de viabilidad). Se seleccionaron las concentraciones 100, 50, 25 y 10  $\mu\text{g/ml}$  para proseguir con el estudio de la actividad protectora.

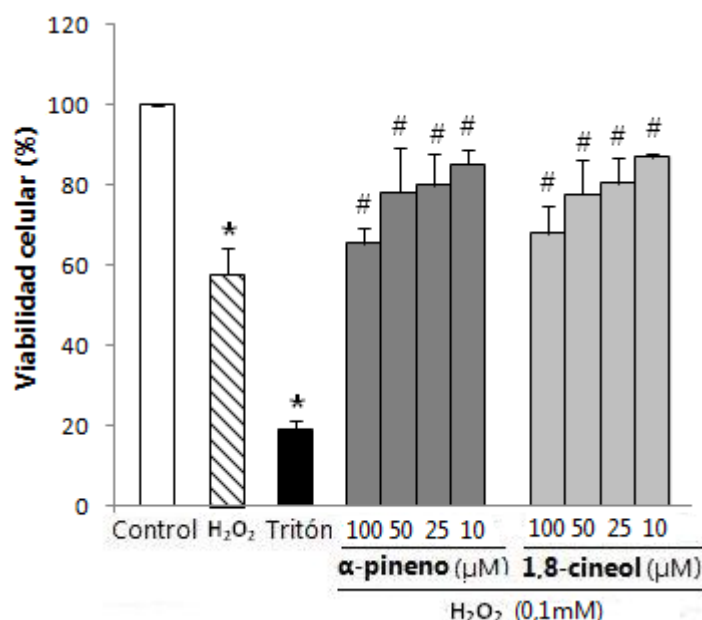
#### 2.1.2.2. EFECTO PROTECTOR FRENTE A LA TOXICIDAD INDUCIDA POR $\text{H}_2\text{O}_2$

Tras establecer el rango de concentraciones no citotóxicas sobre la línea celular PC12, se estudia el posible papel neuroprotector *in vitro* de  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol** en un modelo de estrés oxidativo inducido por  $\text{H}_2\text{O}_2$  en células PC12. Para ello, se utiliza el método MTT como en el apartado anterior.

Las células se tratan durante 24 horas con los diferentes monoterpenos en estudio (100-10  $\mu\text{M}$ ) y se incuban posteriormente con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,1 mM) durante 30 minutos, midiendo la protección que ejercen los monoterpenos frente al inductor de estrés oxidativo,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , mediante la determinación de la viabilidad de las células.

Tal como se aprecia en la **Figura 58**, la exposición de las células PC12 solamente a  $\text{H}_2\text{O}_2$  tiene como consecuencia una significativa reducción de la viabilidad celular respecto a las células control (100% de viabilidad celular).

El pretratamiento con las diferentes concentraciones de  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol** (100, 50, 25 y 10  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas produce un incremento de la viabilidad en la línea celular PC12 respecto a las células sometidas exclusivamente a estrés. Esto nos indica que  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol** disminuyen el daño celular producido por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ocasionando una protección frente a este inductor de estrés oxidativo.



**Figura 58. Actividad citoprotectora de los monoterpenos  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol frente a la toxicidad inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Las células PC12 tratadas con diferentes concentraciones (100, 50, 25 y 10  $\mu$ M) de los monoterpenos durante 24 horas, previo a una exposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 mM) durante 30 minutos. El porcentaje de células viables se determina mediante la técnica de MTT. Como control positivo se utilizan células sin tratar y como control negativo células tratadas con Tritón X-100. Datos expresados como media  $\pm$  SD (n=3). \* $p$ <0,05 vs control y # $p$ <0,05 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos anteriormente, se seleccionan dos concentraciones, 25 y 10  $\mu$ M, que no afectan a la viabilidad celular y que presentan efecto protector para proseguir el estudio de  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol** en células PC12 frente al daño oxidativo.

### 2.1.2.3. EFECTO SOBRE LA MORFOLOGÍA CELULAR

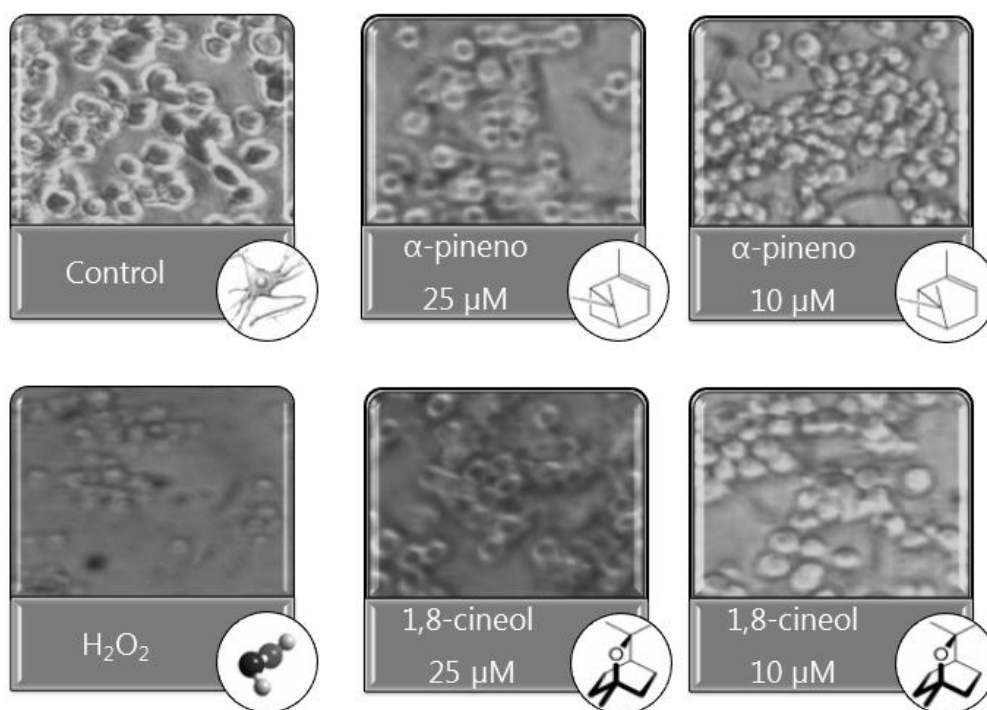
Se ha estudiado así mismo la morfología de las células PC12 tras los tratamientos con los monoterpenos  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol** mediante observación con un microscopio de contraste de fase (NIKON TMS).

Las células control presentan una morfología redondeada característica. Sin embargo, cuando las células se tratan con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 mM) durante 30 minutos,



adquieren formas menos circulares y de menor tamaño, así mismo el número de células disminuye en comparación con el control.

Como se aprecia en la **Figura 59**, el pretratamiento durante 24 horas con los monoterpenos en estudio, previo al tratamiento con  $H_2O_2$ , disminuye los cambios morfológicos inducidos por el mismo, presentando las células su aspecto normal redondeado y de mayor tamaño, siendo este efecto especialmente destacable en el caso del **1,8-cineol** a la concentración de 10  $\mu M$ . Así mismo se observa que no disminuye el número de células con ninguno de los dos compuestos en estudio.

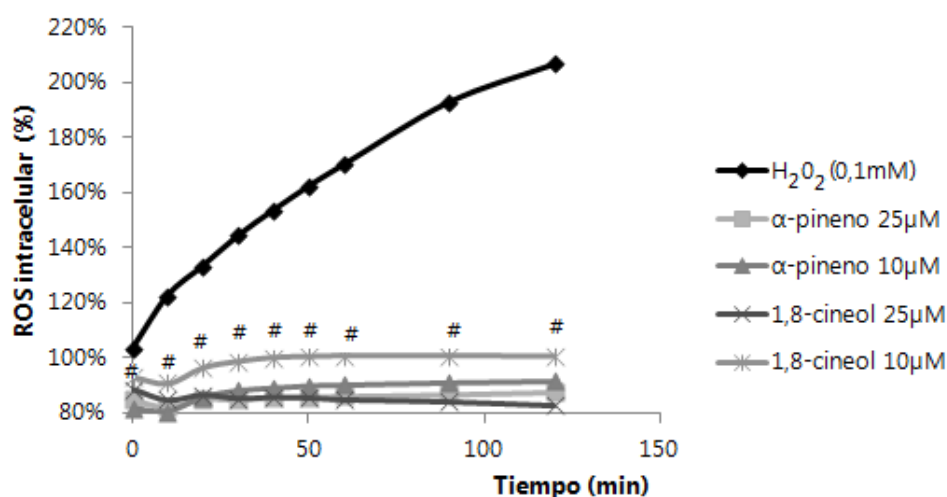


**Figura 59. Morfología celular.** Efecto sobre la morfología de las células PC12 de los tratamientos con los monoterpenos  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol (25 y 10  $\mu M$ ) durante 24 horas y 30 minutos de exposición a  $H_2O_2$  (0,1 mM); así como de las células sin tratar (control) y las células incubadas con  $H_2O_2$  únicamente. Las imágenes corresponden a fotografías representativas de cada uno de los tratamientos, utilizando una cámara Moticam acoplada a microscopio de contraste de fase.

#### 2.1.2.4. EFECTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ROS

Se determina la actividad inhibitoria de ROS intracelular ejercida por  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol** en células PC12, mediante la evaluación del efecto inductor de estrés oxidativo del  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,1 mM). Para ello, se mide la intensidad de la fluorescencia, comparándola con las células control consideradas 100% a cada tiempo, mediante el método de la diclorofluoresceína.

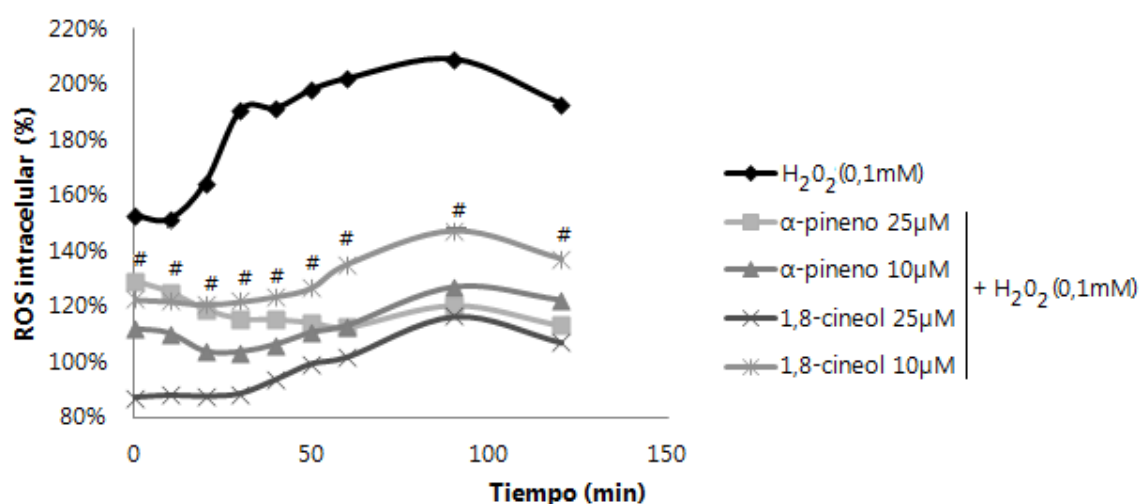
A continuación, en la **Figura 60** se muestran los resultados de los monoterpenos a las concentraciones ensayadas (25 y 10  $\mu\text{M}$ ) sobre la línea celular PC12. Como se puede observar en la gráfica, ninguno de los dos monoterpenos objeto de estudio genera ROS de forma estadísticamente significativa en comparación con las células únicamente tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



**Figura 60. Efecto de  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol sobre la liberación de ROS intracelular.** Las células PC12 se incuban con DCFH-DA durante 30 minutos, en oscuridad a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$ . A continuación, se tratan con diferentes concentraciones de los monoterpenos en estudio (25 y 10  $\mu\text{M}$ ) y se comparan con las células únicamente tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,1mM). Datos expresados como media  $\pm$  SD (n=3). # $p < 0,05$  vs  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

➤ **Efecto neuroprotector frente a la neurotoxicidad inducida por  $H_2O_2$**

Para continuar con el estudio de la capacidad captadora de ROS se analiza el posible efecto neuroprotector de  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol** (25 y 10  $\mu$ M) ante un estado de estrés oxidativo inducido por  $H_2O_2$ . El ensayo se realiza pretratando las células PC12 con los monoterpenos en estudio y posteriormente con  $H_2O_2$  (0,1 mM).



**Figura 61. Efecto de  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol sobre la formación de ROS intracelular.** Las neuronas se tratan con los monoterpenos (25 y 10  $\mu$ M) y se induce un estado de estrés oxidativo con  $H_2O_2$  (0,1 mM). Los niveles de ROS se determinan mediante fluorescencia ( $\lambda_{exc}=480nm$  y  $\lambda_{em}=510nm$ ) durante 2 horas. Los datos se expresan como media  $\pm$  SD (n=3). # $p < 0,05$  vs  $H_2O_2$ .

Como se observa en la **Figura 61**, el tratamiento de las células con  $H_2O_2$  produce un aumento significativo en la liberación de ROS. Sin embargo, en células expuestas a un estado de estrés oxidativo en presencia de  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol**, la generación intracelular de ROS disminuye de forma significativa. Es decir, el tratamiento con los monoterpenos en estudio ejerce un efecto protector frente al estrés oxidativo.

#### 2.1.2.5. EFECTO SOBRE EL SISTEMA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO

Para completar el estudio, se analiza la expresión proteica de las principales enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPx, GR y HO-1) ocasionada por  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol** en las células PC12 expuestas a daño oxidativo mediado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mediante la técnica de Western Blot.

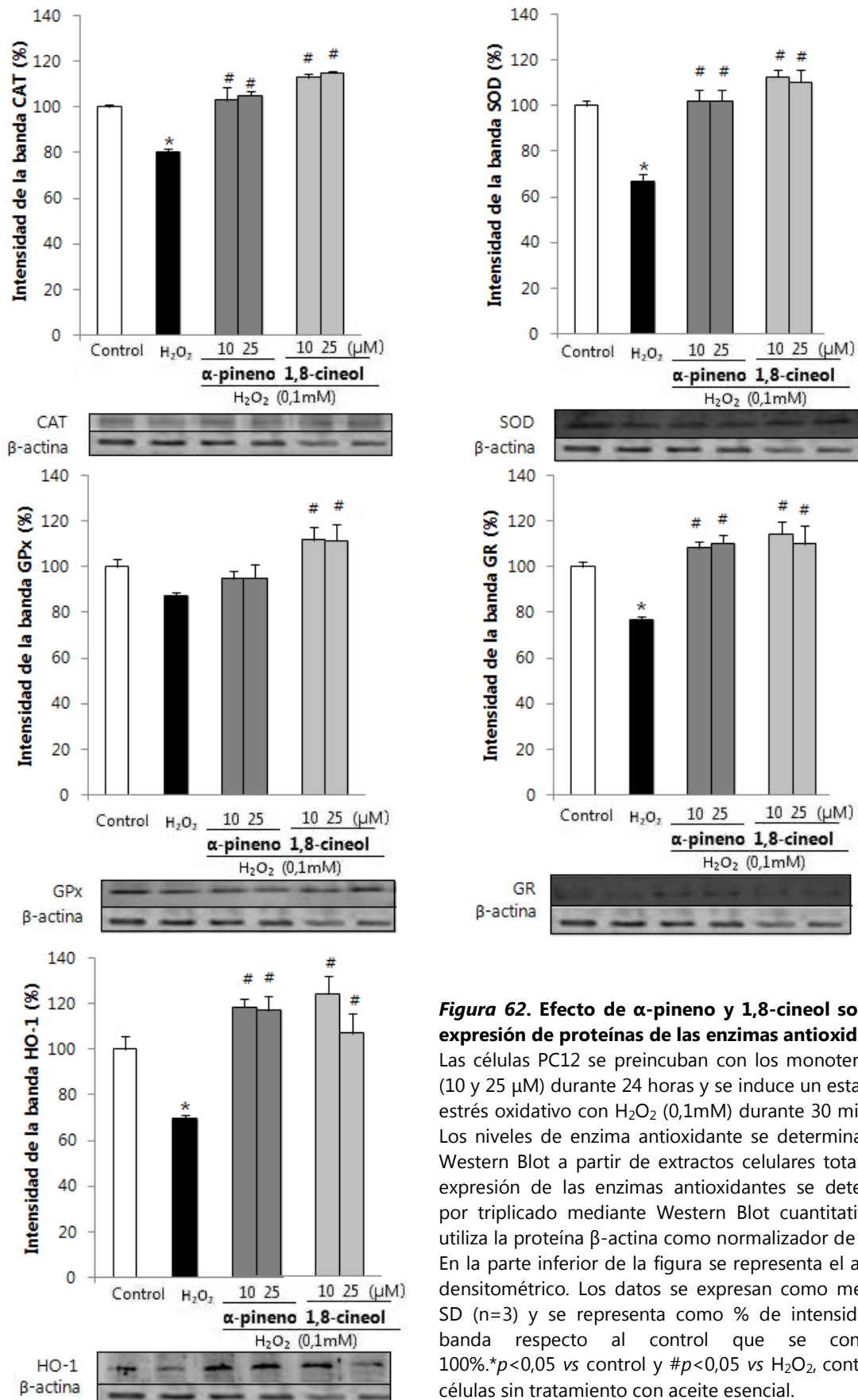
Para ello, las células se pretratan durante 24 horas con distintas concentraciones de  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol** (25 y 10  $\mu$ M) y se incuban con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 mM) durante 30 minutos. La producción de enzimas antioxidantes se evalúa determinando la expresión proteica de las enzimas de los extractos totales de las células tratadas.

Como se puede apreciar en la **Figura 62**, cuando las células son estimuladas sólo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se produce una disminución significativa de la expresión de estas enzimas antioxidantes.

Sin embargo, en las células pretratadas con los monoterpenos  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol** y posteriormente incubadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se observa un incremento significativo de la expresión proteica de las enzimas antioxidantes al inducir los sistemas protectores antioxidantes, atenuando el daño oxidativo producido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Concretamente, en el estudio de la expresión de la enzima catalasa (**CAT**) se observa una mayor expresión de los monoterpenos en estudio, siendo especialmente marcado el aumento ocasionado por **1,8-cineol**.

Por otra parte, en el estudio de la expresión de la enzima superóxido dismutasa (**SOD**) se observa un aumento de su expresión con ambos monoterpenos, especialmente en **1,8-cineol** a ambas concentraciones, al igual que ocurre en CAT.



**Figura 62. Efecto de  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol sobre la expresión de proteínas de las enzimas antioxidantes.**

Las células PC12 se preincubaron con los monoterpenos (10 y 25  $\mu$ M) durante 24 horas y se induce un estado de estrés oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1mM) durante 30 minutos. Los niveles de enzima antioxidante se determinan por Western Blot a partir de extractos celulares totales. La expresión de las enzimas antioxidantes se determina por triplicado mediante Western Blot cuantitativa. Se utiliza la proteína  $\beta$ -actina como normalizador de carga. En la parte inferior de la figura se representa el análisis densitométrico. Los datos se expresan como media  $\pm$  SD (n=3) y se representa como % de intensidad de banda respecto al control que se considera 100%. \* $p$ <0,05 vs control y # $p$ <0,05 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, control de células sin tratamiento con aceite esencial.

Así mismo, se observa un aumento de la expresión de glutatión peroxidasa (**GPx**) con los monoterpenos en estudio. Este aumento es de nuevo mayor para **1,8-cineol** y de forma estadísticamente significativa en comparación con las células sólo tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a ambas concentraciones.

Por otro lado en la enzima glutatión reductasa (**GR**) se observa un aumento estadísticamente significativo de su expresión con los monoterpenos **α-pineno** y **1,8-cineol** en comparación con las células sólo tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Finalmente, respecto a hemo-oxigenasa 1 (**HO-1**) se observa también un aumento de su expresión con ambos monoterpenos, presentando diferencias estadísticamente significativas en comparación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

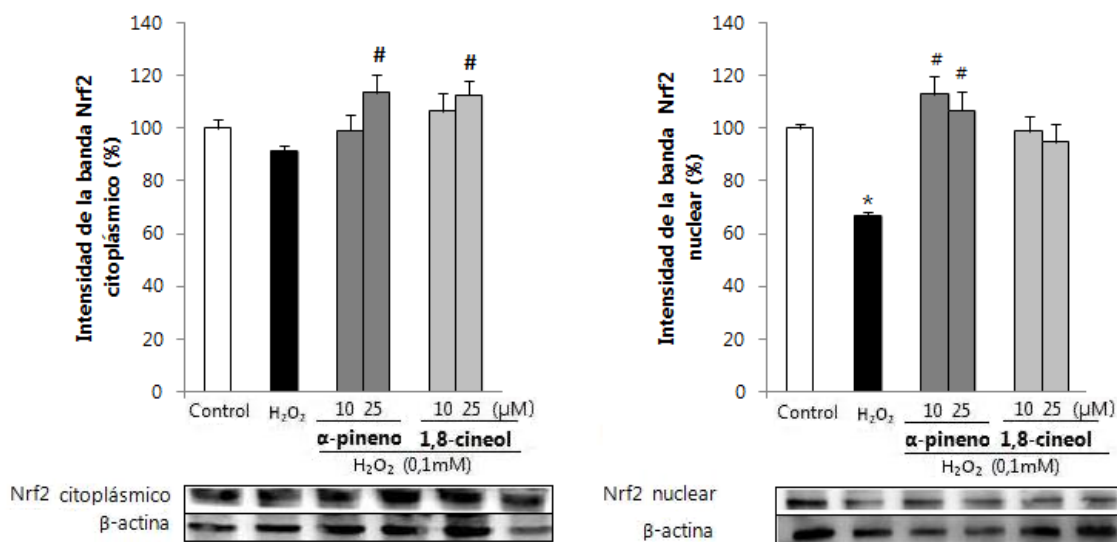
Estos resultados sugieren que **α-pineno** y **1,8-cineol** ejercen un efecto protector en células PC12 contra el estrés oxidativo mediante el aumento de la expresión proteica de las enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPx, GR y HO-1), relacionándose este efecto a la inhibición en la producción de ROS intracelulares inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> demostrada previamente.

#### **2.1.2.6. EFECTO SOBRE LA VÍA NRF2**

Para completar el ensayo y con el fin de determinar si los monoterpenos **α-pineno** y **1,8-cineol** ejercen un efecto potenciador sobre la expresión de las enzimas antioxidantes endógenas, se analizaron los niveles de Nrf2. Se evalúa mediante Western Blot los niveles citosólicos y nucleares de la proteína Nrf2.

Para ello, las células PC12 se pretratan con **α-pineno** y **1,8-cineol** (25 y 10 µM) durante 24 horas y se exponen al inductor de estrés oxidativo, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 mM), durante 30 minutos. Para realizar el estudio se utilizan extractos citosólicos y nucleares de las células.

Como se observa en la **Figura 63**, los monoterpenos inducen protección a las neuronas frente al  $H_2O_2$ , al aumentar la expresión de Nrf2. Los niveles de expresión de la proteína Nrf2 nuclear son mayores que los que se producen en las incubadas sólo con  $H_2O_2$ . Esto sugiere que esta vía está implicada en la inducción de las enzimas antioxidantes estudiadas (CAT, SOD, GPx, GR y HO-1) y por consiguiente, en la protección demostrada en los estudios realizados contra  $H_2O_2$  en células PC12.

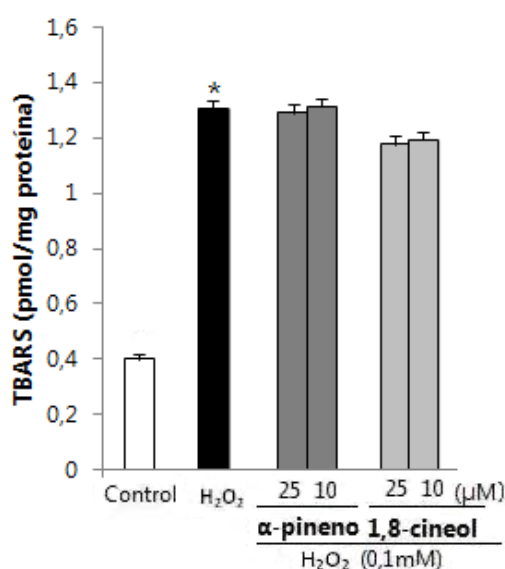


**Figura 63. Efecto de los monoterpenos  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol sobre la expresión de Nrf2 citoplásmico y nuclear.** Las células PC12 se preincubaban *in vitro* con los monoterpenos (25 y 10  $\mu$ M) durante 24 horas y se induce un estado de estrés oxidativo con  $H_2O_2$  (0,1 mM) durante 30 minutos. Los niveles de Nrf2 citoplásmico y nuclear se determinan por Western Blot a partir de extractos citosólicos y nucleares, respectivamente, de células PC12. Los niveles de Nrf2 se determinan por triplicado mediante Western-Blot cuantitativa. Se utiliza la proteína  $\beta$ -actina como normalizador de carga. En la parte inferior de la figura se representa el análisis densitométrico. Los datos se expresan como media  $\pm$  SD (n= 3) y se representa como % de intensidad de banda respecto al control que se considera 100%. <sup>\*</sup> $p < 0,05$  vs control y <sup>#</sup> $p < 0,05$  vs  $H_2O_2$ .

### 2.1.2.7. EFECTO SOBRE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

A continuación se miden los niveles de TBARS para determinar la capacidad los monoterpenos en estudio de inhibir la peroxidación lipídica.

Como se muestra en la **Figura 64**, en las células expuestas a  $H_2O_2$  (0,1 mM) durante 30 minutos se produce un aumento significativo de la concentración de los productos de la peroxidación lipídica (determinados como TBARS) respecto a las células control, sin tratar. Mientras, el tratamiento de las células PC12 con  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol** (25 y 10  $\mu M$ ) durante 24 horas apenas reduce el daño lipídico inducido por  $H_2O_2$ .



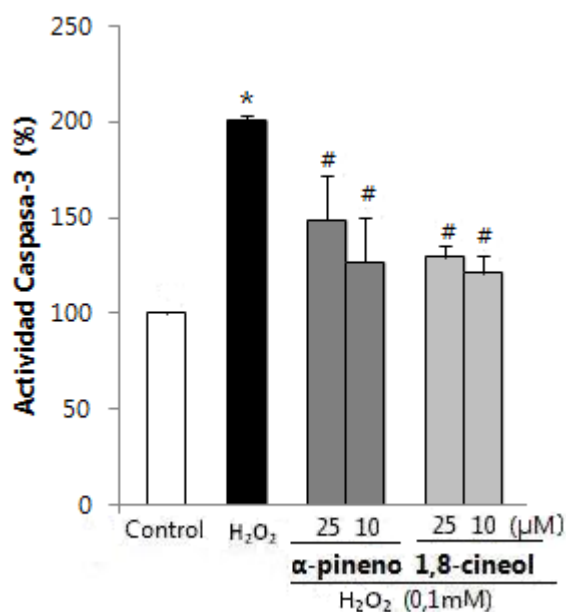
**Figura 64. Efecto sobre la peroxidación lipídica.** Las células PC12 se tratan con los monoterpenos  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol (25 y 10  $\mu M$ ) durante 24 horas y se incuban con  $H_2O_2$  (0,1 mM) durante 30 minutos. Los resultados se expresan como pmol/mg proteína, media  $\pm$  SD (n=3). \* $p < 0,05$  vs control y # $p < 0,05$  vs  $H_2O_2$ .



### 2.1.2.8. EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD DE CASPASA-3

Finalmente, se ha determinado la actividad de la enzima efectora de apoptosis caspasa-3, cuyo sustrato es Ac-DEVD-AMC, para determinar la muerte celular producida por estrés oxidativo.

Esta actividad enzimática se incrementa muy significativamente ante la exposición de las células PC12 a  $H_2O_2$  (0,1 mM) durante 30 minutos. Los datos obtenidos demuestran que el tratamiento de las células con  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol** durante 24 horas atenúa el aumento de la actividad de la caspasa, en comparación con las células tratadas únicamente con  $H_2O_2$ , de forma estadísticamente significativa (**Figura 65**).



**Figura 65. Efecto de  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol sobre la actividad de caspasa-3 en células PC12.**

Las células PC12 se tratan con  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol a las concentraciones 25 y 10  $\mu$ M durante 24 horas y se incuban durante 30 minutos con  $H_2O_2$  (0,1 mM). La actividad de la caspasa-3 se determina en extractos celulares totales mediante la medida en un fluorímetro, utilizando el sustrato específico Ac-DEVD-AMC. Los resultados se representan como % respecto al control (100%, células sin tratar). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SD (n= 3). \* $p$ <0,05 vs control y # $p$ <0,05 vs  $H_2O_2$ .

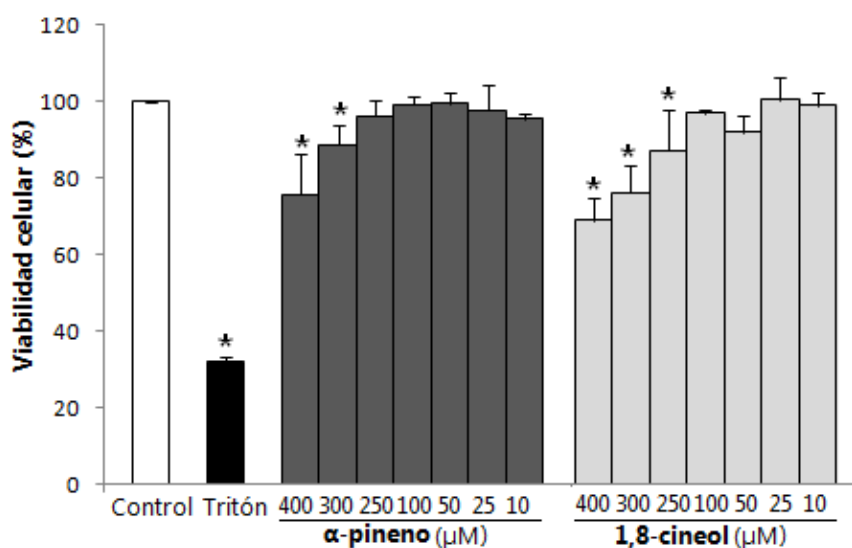
### 2.1.3. Actividad citoprotectora sobre la línea celular U373-MG en modelo de estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Una vez estudiado el efecto neuroprotector de  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol** en células PC12 (modelo neuronal) se procede a estudiar su efecto sobre astrocitos utilizando células de la línea celular U373-MG.

#### 2.1.3.1. CITOTOXIDAD CELULAR

Inicialmente, se estudia el efecto del tratamiento durante 24 horas de diferentes concentraciones de  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol** sobre la viabilidad de las células U373-MG mediante el ensayo de reducción del MTT.

Las células U373-MG se tratan con las muestras de monoterpenos en estudio en un amplio rango de concentraciones (400-10  $\mu$ M) durante 24 horas a 37°C y se estudia el efecto sobre la viabilidad. Como control negativo se usa Tritón X-100.



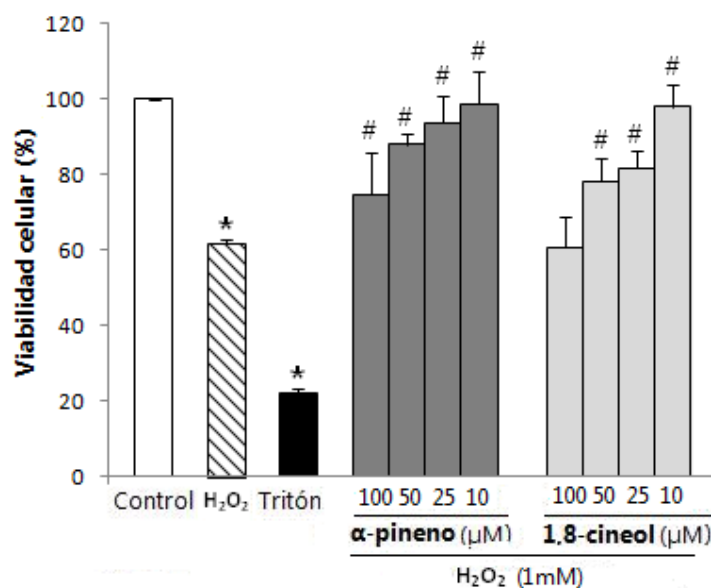
**Figura 66. Efecto de  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol sobre la viabilidad celular.** Las células U373-MG son incubadas con los monoterpenos a distintas concentraciones (400-10  $\mu$ M) durante 24 horas. El % de células viables se determina, tras añadir la solución de MTT y medir mediante colorimetría la capacidad de reducción celular del MTT. Como control positivo de la viabilidad se utilizan células sin tratar con los monoterpenos. Los resultados se expresan como % respecto al control, definiéndose 100% la viabilidad de las células sin tratar. Datos expresados como media  $\pm$  SD (n= 3). \* $p$ <0,05, vs control.

Como se muestra en la **Figura 66**, los resultados del ensayo de MTT revelan que las concentraciones menores ensayadas para  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol** no modifican la viabilidad de las células U373-MG en comparación con las células control (100% de viabilidad). Por el contrario, en las células tratadas con Tritón X-100 se produce un aumento en muerte celular.

### 2.1.3.2. EFECTO PROTECTOR FRENTE A LA TOXICIDAD INDUCIDA POR $H_2O_2$

A continuación, tras establecer las concentraciones no citotóxicas, se determina el efecto citoprotector *in vitro* de  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol** frente al daño oxidativo inducido por  $H_2O_2$  sobre las células U373-MG por el método de MTT.

Para ello, se evalúa el efecto del pretratamiento durante 24 horas con los monoterpenos en estudio  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol** (100, 50, 25 y 10  $\mu$ M) y posteriormente con  $H_2O_2$  (1 mM), como inductor de estrés oxidativo, durante 30 minutos.



**Figura 67. Actividad citoprotectora de  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol en un modelo de estrés oxidativo inducido por  $H_2O_2$ .** Las células U373-MG tratadas con diferentes concentraciones (100, 50, 25 y 10  $\mu$ M) de los monoterpenos en estudio durante 24 horas, previo a una exposición de  $H_2O_2$  (1 mM) durante 30 minutos. El porcentaje de células viables se determina mediante el método de reducción celular del MTT. Datos expresados como porcentaje de viabilidad, media  $\pm$  SD (n=3). \* $p$ <0,05 vs control y # $p$ <0,05 vs  $H_2O_2$ .

Tal y como se aprecia en la **Figura 67**, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causa una significativa disminución de la viabilidad celular comparado con las células control (100%) bajo las condiciones experimentales establecidas.

Se observa que el pretratamiento con los monoterpenos durante 24 horas, previo a la exposición con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, genera una mayor supervivencia y por tanto un efecto protector sobre los astrocitos frente a células tratadas únicamente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, al incrementar de forma estadísticamente significativa la viabilidad celular en células sometidas a estrés oxidativo, siendo las concentraciones más bajas las que ejercen el mayor efecto. La mayor protección frente al tóxico la presenta la concentración de 10 µM.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se seleccionaron dos concentraciones 25 y 10 µM, que no afectan a la viabilidad celular y que presentan efecto citoprotector, para evaluar en sucesivos ensayos el mecanismo por el cual **α-pineno** y **1,8-cineol** protegen a las células U373-MG del daño inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

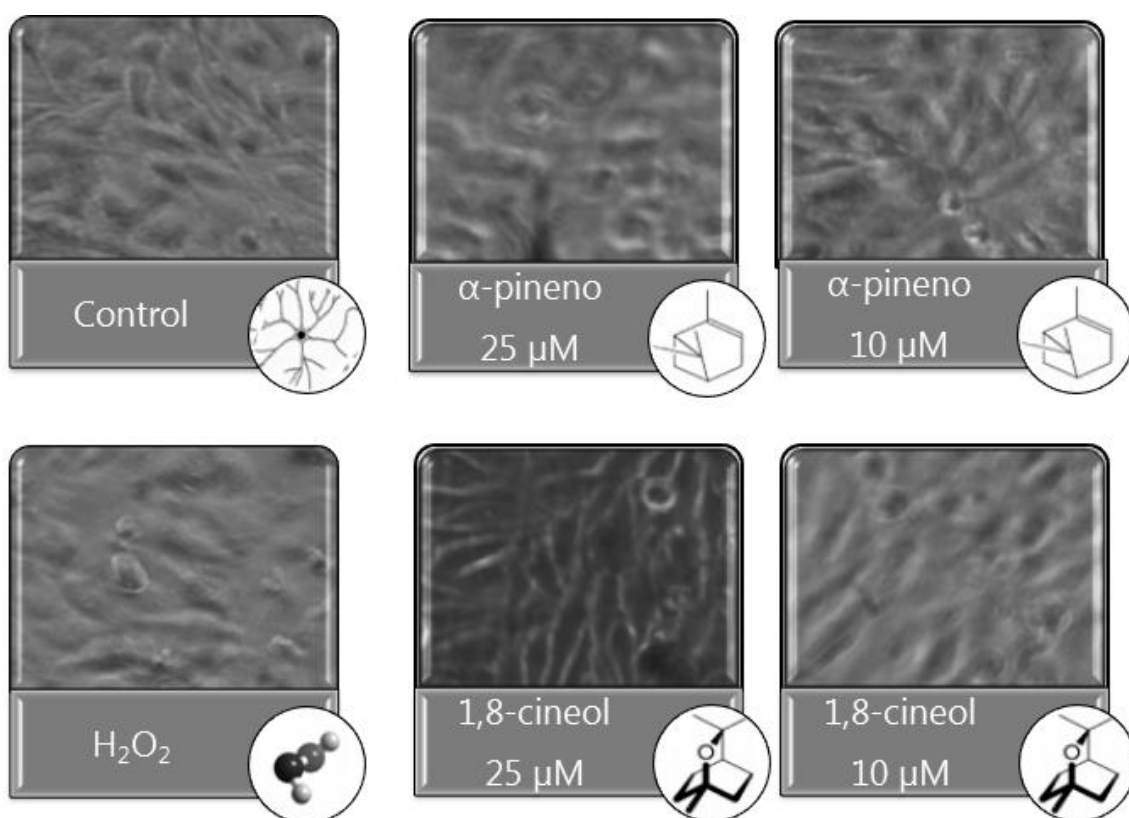
#### **2.1.3.3. EFECTO SOBRE LA MORFOLOGÍA CELULAR**

Para completar este estudio, se ha observado la morfología de las células tras los tratamientos con **α-pineno** y **1,8-cineol** mediante un microscopio de contraste de fase (NIKON TMS).

Las células control presentaban una morfología estrellada característica (**Figura 68**). Como se puede observar en la imagen, las células control presentan prolongaciones, grandes y numerosas.

Sin embargo, cuando las células se tratan con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) durante 30 minutos, se producen una serie de cambios morfológicos, pierden ramificaciones y disminuyen en número.

El pretratamiento durante 24 horas con  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol**, previo al tratamiento con  $H_2O_2$ , disminuye los cambios morfológicos inducidos por el mismo, presentando las células su aspecto normal estrellado y de mayor tamaño. Se observa igualmente que no disminuye el número de células con ninguno de los monoterpenos en estudio.

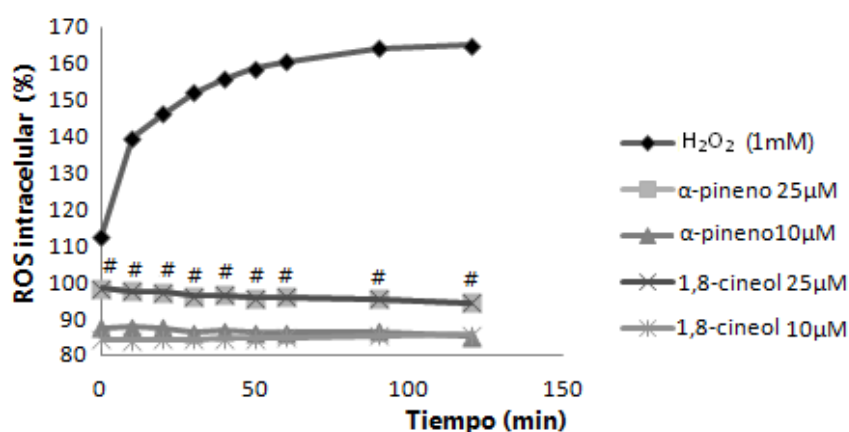


**Figura 68. Morfología celular.** Efecto sobre la morfología de las células U373-MG de los diferentes tratamientos con  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol (25 y 10  $\mu$ M) durante 24 horas y 30 minutos de exposición a  $H_2O_2$  (1 mM); así como de las células sin tratar (control) y las células incubadas con  $H_2O_2$  únicamente. Las imágenes corresponden a fotografías representativas de cada uno de los tratamientos, utilizando una cámara Moticam acoplada a microscopio de contraste de fase.

#### 2.1.3.4. EFECTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ROS

A continuación se determina la capacidad generadora de ROS intracelulares en células U373 MG por  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol**, en las condiciones experimentales establecidas en el estudio, mediante el ensayo de la diclorofluoresceína (DCFH-DA).

Como se puede observar en la **Figura 69** en células tratadas únicamente con  $H_2O_2$  los niveles de ROS aumentan significativamente. Mientras, los monoterpenos en estudio, no estimulan *per se* la formación de ROS a las concentraciones estudiadas.



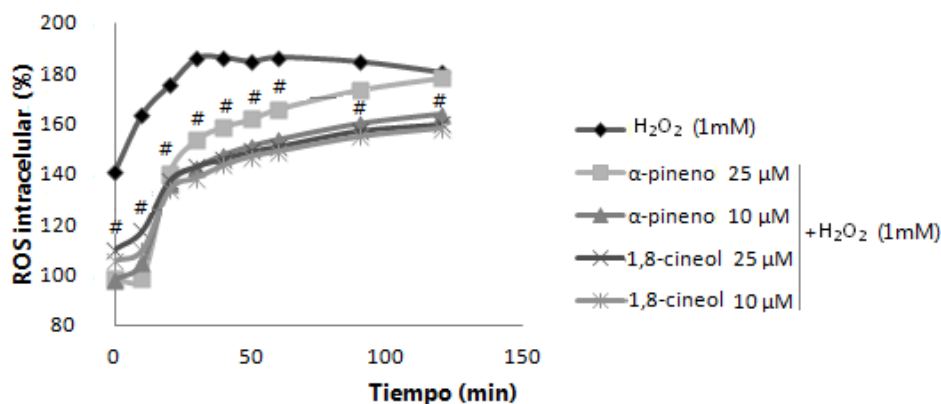
**Figura 69. Efecto  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol sobre la producción de ROS intracelular.** Las células U373-MG se incuban con DCFH-DA durante 30 minutos, en oscuridad a 37°C y 5% de  $CO_2$ . A continuación, se tratan con los diferentes monoterpenos en estudio (25 y 10  $\mu$ M) y se comparan con las células únicamente tratadas con  $H_2O_2$  (1 mM). Datos expresados como media  $\pm$  SD (n=3). \* $p < 0,05$  vs control y # $p < 0,05$  vs  $H_2O_2$ .

#### ➤ Efecto neuroprotector frente a la neurotoxicidad inducida por la $H_2O_2$ .

A continuación se evalúa el efecto de  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol** sobre la producción de ROS inducida por  $H_2O_2$  durante 30 minutos. Tal y como se observa en la **Figura 70**, la incubación de las células con  $H_2O_2$  (1 mM) produce un aumento significativo en la liberación de ROS en células U373-MG sometidas a estrés oxidativo por  $H_2O_2$ .

En este ensayo se observa que  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol** (25 y 10  $\mu$ M) disminuyen la presencia de ROS generadas por  $H_2O_2$  a diferentes concentraciones, siendo **1,8-cineol**

el que mejores resultados presenta (decrecimiento en la producción de ROS de un 30-45%).



**Figura 70. Efecto de  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol sobre la formación de ROS intracelular inducida por el  $H_2O_2$ .** Las células U373-MG se tratan con los monoterpenos (25 y 10  $\mu$ M) y se induce un estado de estrés oxidativo con  $H_2O_2$  (1 mM). Los niveles de ROS se determinan mediante fluorescencia. Los datos se expresan como media  $\pm$  SD (n=3). # $p$ <0,05 vs  $H_2O_2$ , control de células tratadas únicamente con  $H_2O_2$  respecto al tiempo.

#### 2.1.3.5. EFECTO SOBRE EL SISTEMA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO

Para completar el estudio, se analiza la expresión proteica de las enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPx, GR y HO-1) ocasionada por medio de los diferentes monoterpenos a las concentraciones en estudio, en las células expuestas a daño oxidativo mediado por  $H_2O_2$ , mediante la técnica de Western Blot.

Para la determinación de la expresión de las enzimas antioxidantes, las células U373-MG se pretratan durante 24 horas con  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol** (25 y 10  $\mu$ M) y se inducen a un estado de estrés oxidativo por  $H_2O_2$  (1 mM) durante 30 minutos. La producción de enzimas antioxidantes se evalúa determinando la expresión proteica de los extractos totales de las células U373-MG tratadas.

Se demuestra de este modo (**Figura 71**) que cuando las células son estimuladas sólo con  $H_2O_2$  se produce una disminución significativa de la expresión de estas

enzimas antioxidantes. Mientras que el tratamiento de las células U373 MG con  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol** incrementa, de forma significativa, la expresión de las enzimas antioxidantes atenuando el efecto dañino del  $H_2O_2$ .

Los resultados obtenidos tras analizar la expresión de las enzimas antioxidantes muestran que dicha expresión aumenta en presencia de los monoterpenos en estudio, en células U373-MG expuestas a un estado de estrés oxidativo con  $H_2O_2$ , como se desprende de la cuantificación realizada mediante densitometría.

Concretamente, en el estudio de la expresión de catalasa (**CAT**) se observa una disminución de la expresión de la enzima en las células únicamente tratadas con  $H_2O_2$ . Mientras que se observa un aumento de su expresión proteica con **1,8-cineol**, siendo estadísticamente significativo el aumento ocasionado a ambas concentraciones (10 y 25  $\mu$ M).

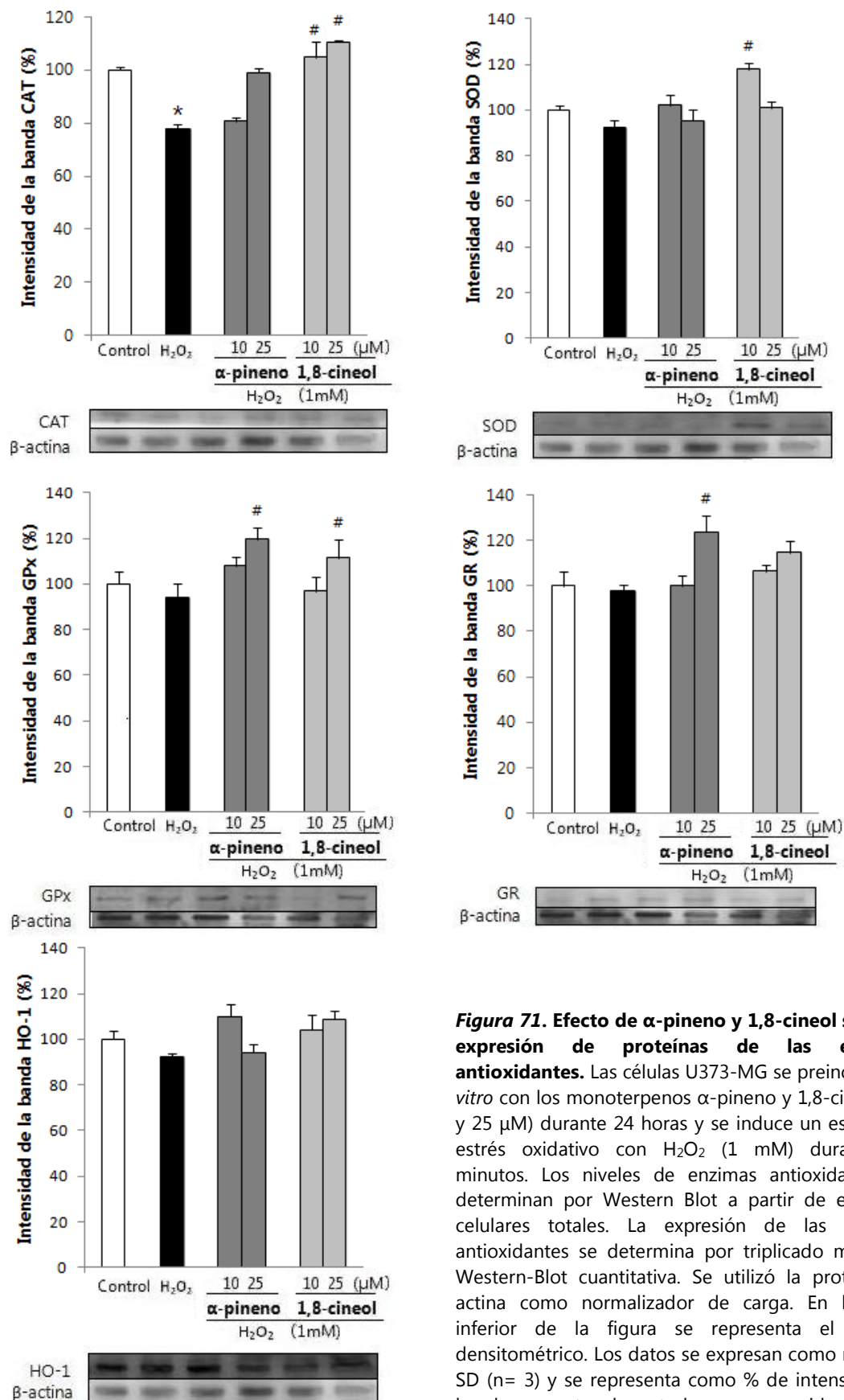
En el estudio de la expresión de superóxido dismutasa (**SOD**) se observa un aumento estadísticamente significativo de la expresión proteica de la enzima en **1,8-cineol** a su menor concentración, 10  $\mu$ M.

Mientras, en el estudio de la expresión proteica de la enzima glutatión peroxidasa (**GPx**) se observa una mayor expresión de proteínas, de forma estadísticamente significativa comparada con las células sólo tratadas con  $H_2O_2$ , de ambos monoterpenos a la concentración 25  $\mu$ M.

Por otro lado en la enzima glutatión reductasa (**GR**) se muestra una mayor expresión proteica de forma estadísticamente significativa en  **$\alpha$ -pineno** a concentración 25  $\mu$ M en comparación con las células únicamente tratadas con  $H_2O_2$ .

Finalmente, respecto hemo-oxigenasa 1 (**HO-1**) se observan ligeras diferencias respecto a  $H_2O_2$ .

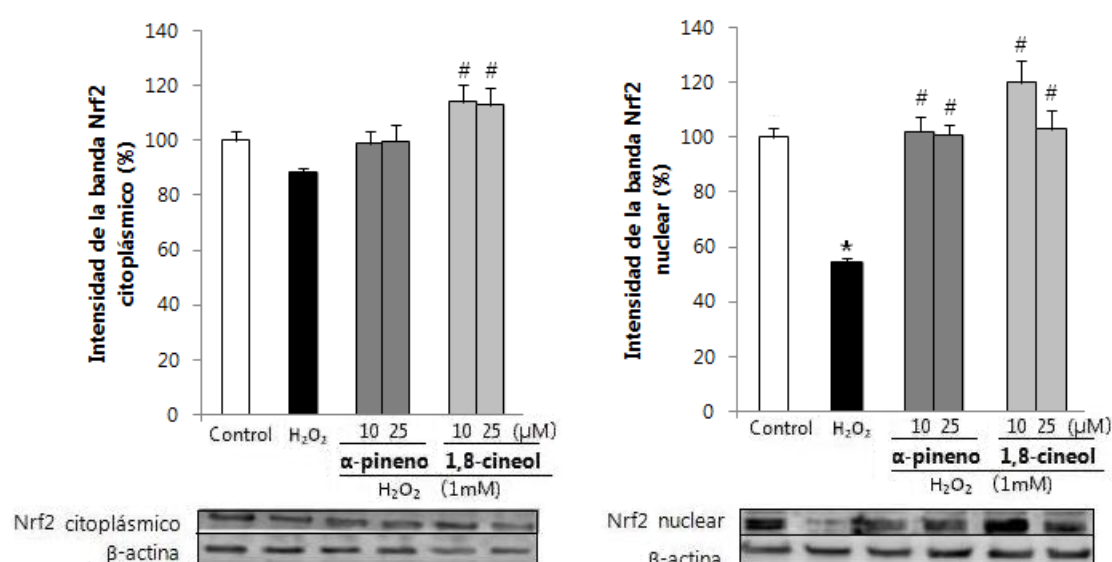




**Figura 71. Efecto de  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol sobre la expresión de proteínas de las enzimas antioxidantes.** Las células U373-MG se preincubaron *in vitro* con los monoterpenos  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol (10 y 25  $\mu$ M) durante 24 horas y se induce un estado de estrés oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) durante 30 minutos. Los niveles de enzimas antioxidantes se determinan por Western Blot a partir de extractos celulares totales. La expresión de las enzimas antioxidantes se determina por triplicado mediante Western-Blot cuantitativa. Se utilizó la proteína  $\beta$ -actina como normalizador de carga. En la parte inferior de la figura se representa el análisis densitométrico. Los datos se expresan como media  $\pm$  SD (n= 3) y se representa como % de intensidad de banda respecto al control que se considera 100%. \* $p < 0,05$  vs control y # $p < 0,05$  vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, control de células sin tratamiento con aceite esencial.

### 2.1.3.6. EFECTO SOBRE LA VÍA NRF2

Para completar el ensayo, se evalúa el efecto de  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol** sobre la expresión del factor Nrf2, con el fin de comprobar si la inducción de las enzimas antioxidantes por los monoterpenos se produce a través de la activación de esta vía Nrf2. Se evalúa mediante Western Blot los niveles citosólicos y nucleares (**Figura 72**) de la proteína Nrf2.



**Figura 72. Efecto  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol sobre la expresión de Nrf2 citoplásmico y nuclear.** Las células U373-MG se preincubaban *in vitro* con los monoterpenos  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol (10 y 25  $\mu$ M) durante 24 horas y se induce un estado de estrés oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) durante 30 minutos. Los niveles de Nrf2 citoplásmico y nuclear se determinan por Western Blot a partir de extractos citosólicos y nucleares, respectivamente, de células U373-MG. Se utiliza la proteína  $\beta$ -actina como normalizador de carga. En la parte inferior de la figura se representa el análisis densitométrico. La imagen muestra un experimento representativo de tres. Los datos se expresan como media  $\pm$  SD (n= 3) y se representa como % de intensidad de banda respecto al control que se considera 100%. \* $p$ <0,05 vs control y # $p$ <0,05 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, control de células sin tratamiento con aceite esencial.

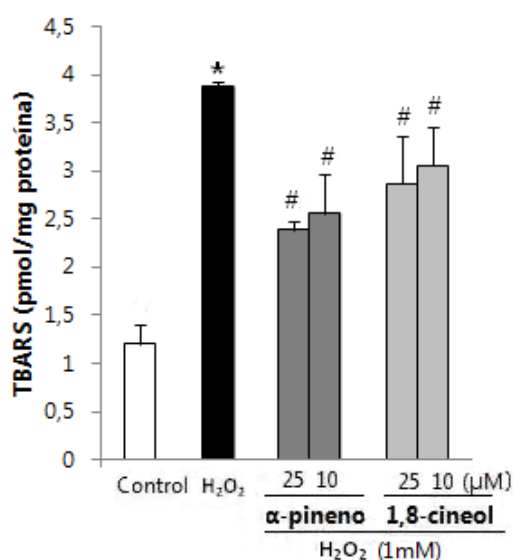
Se preparan para ello extractos citosólicos y nucleares respectivamente, tras el pretratamiento de las células U373-MG con  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol** (25 y 10  $\mu$ M) durante 24 horas y la exposición al inductor de estrés oxidativo, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM), durante 30 minutos. Como se muestra a continuación en la **Figura 72**, los monoterpenos inducen protección de los astrocitos frente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, al inducir la expresión de la

proteína citoplásmica y nuclear Nrf2 de manera estadísticamente significativa en células U373-MG.

Por tanto, los niveles de expresión de la proteína Nrf2 son significativamente mayores en las células pretratadas con  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol** durante 24 horas que en las incubadas sólo con  $H_2O_2$ . Además, los niveles de expresión de la proteína nuclear Nrf2 son mayores en las células pretratadas con  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol**, a ambas concentraciones. Esto indica que la actividad del aceite esencial a nivel de las enzimas antioxidantes se debe a la activación de la vía Nrf2.

#### 2.1.3.7. EFECTO SOBRE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Mediante la medida de los niveles de TBARS se mide la degradación oxidativa de lípidos y determinamos así la capacidad de  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol** para inhibir la peroxidación lipídica.

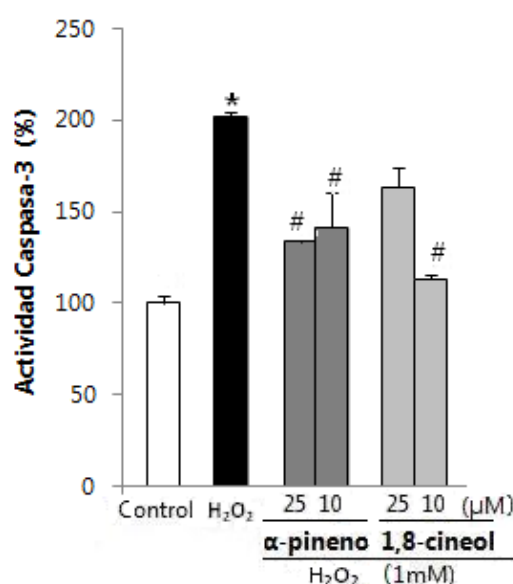


**Figura 73. Efecto sobre la peroxidación lipídica.** Las células U373-MG se tratan con  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol (25 y 10  $\mu$ M) durante 24 horas y se incuban con  $H_2O_2$  (1 mM) durante 30 minutos. Los resultados se expresan como pmol/mg proteína, media  $\pm$  SD (n= 3). \* $p$ <0,05 vs control y # $p$ <0,05 vs  $H_2O_2$ .

Tal y como se muestra en la **Figura 73**, en las células expuestas a condiciones de estrés oxidativo inducido por  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM) durante 30 minutos se produce un aumento significativo de la concentración TBARS respecto a las células control. Sin embargo, el pretratamiento de las células U373-MG con  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol** durante 24 horas da lugar a la reducción de la formación de subproductos de la peroxidación lipídica en las condiciones de estrés oxidativo inducida por  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Esta reducción es significativa para ambos monoterpenos en todas las concentraciones ensayadas.

### 2.1.3.8. EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD DE CASPASA-3

Dado que  **$\alpha$ -pineno** y **1,8-cineol** producen un descenso en la liberación de ROS, se evalúa si ambos monoterpenos protegen a los astrocitos de la apoptosis inducida por  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Para ello, se realizan estudios concentración-respuesta con los monoterpenos, con el fin de determinar el porcentaje de células apoptóticas mediante fluorimetría, utilizando como sustrato Ac-DEVD-AMC.



**Figura 74. Efecto de  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol sobre la actividad de caspasa-3.** Las células U373-MG se pretratan con  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol a diferentes concentraciones (25 y 10  $\mu\text{M}$ ) durante 24 horas y se incuban con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM) durante 30 minutos. La actividad de la caspasa-3 se determina en extractos celulares totales mediante fluorimetría, utilizando el sustrato específico Ac-DEVD-AMC. Los resultados se representan como % respecto al control (100%, células sin tratar). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SD (n= 3). \* $p$ <0,05 vs control y # $p$ <0,05 vs  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Los resultados expuestos en la **Figura 74** muestran que la incubación de las células U373 MG con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produce un aumento rápido de la apoptosis al liberarse la caspasa-3, cuantificado por el incremento del porcentaje de fluorescencia. Por el contrario, la preincubación de las células con **α-pineno** y **1,8-cineol** a las concentraciones ensayadas reduce significativamente la actividad caspasa-3.

# **DISCUSIÓN**



En condiciones fisiológicas en el organismo existe un equilibrio entre los niveles de especies reactivas de oxígeno y el sistema de defensa antioxidante. Sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo ese equilibrio se rompe produciendo daño en las células como consecuencia de una excesiva producción de ROS o de un deficiente efecto de los mecanismos antioxidantes endógenos (Jones, 2008). La acumulación de daño oxidativo está relacionado con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, de Parkinson, la Esclerosis Lateral Amiotrófica o la enfermedad de Huntington, de gran prevalencia en la sociedad actual (Gandhi & Abramov, 2012).

Se ha comprobado científicamente que el uso de antioxidantes naturales previene y protege frente a los efectos dañinos y degenerativos producidos por los radicales libres (Niki et al, 2005; Adams et al., 2007; Choi et al., 2012; González-Burgos & Gómez-Serranillos, 2012).

En este contexto, los aceites esenciales de algunas plantas contienen una amplia y variada cantidad de compuestos con propiedades interesantes en medicina, como propiedades antioxidantes que generan efectos beneficiosos en la salud al prevenir desórdenes asociados con la edad (Miguel, 2010; Gandhi & Abramov, 2012).

Se ha observado que especies aromáticas y medicinales del género *Salvia* (Lamiaceae), presentan un elevado contenido en aceite esencial (Sáez, 2010), el cual ha sido utilizado tradicionalmente por sus propiedades terapéuticas, entre ellas propiedades protectoras potencialmente relevantes en la función cerebral por sus efectos beneficiosos sobre la memoria (Lima et al., 2004; Perry et al., 1998).

#### ▪ **SALVIA LAVANDULIFOLIA**

Como se ha comentado anteriormente en la revisión bibliográfica, el **aceite esencial** de *Salvia lavandulifolia* (Salvia española) ha despertado un gran interés dado



que como se ha observado en estudios *in vitro*, *in vivo* e incluso en ensayos clínicos, produce efectos significativos sobre la cognición al inhibir la enzima acetilcolinesterasa (Perry *et al.*, 2000a; Perry *et al.*, 2002; Savelev *et al.*, 2003). Además presenta actividad antioxidante y antiinflamatoria. Ello constituye una alternativa para el tratamiento farmacológico de los trastornos del sistema nervioso central como la enfermedad de Alzheimer (Perry *et al.*, 2003). Sin embargo, hasta el momento no se han llevado a cabo estudios sobre la posible actividad antioxidante del aceite esencial de *S. lavandulifolia* sobre células del sistema nervioso central como neuronas y astrocitos.

Por otro lado, se han descrito un gran número de monoterpenos con actividad antiacetilcolinesterasa y antioxidante, entre los cuales podemos encontrar algunos de los compuestos identificados en el aceite esencial de *S. lavandulifolia*.

Tanto la actividad comprobada para el aceite esencial de Salvia española como la de algunos de los monoterpenos que se encuentran en el mismo podrían incidir en la respuesta frente a situaciones de estrés oxidativo que acompaña a las enfermedades neurodegenerativas, al disminuir los efectos nocivos causados por los inductores de daño celular en el organismo (Perry *et al.*, 2001; Tildesley *et al.*, 2003; Savelev *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2007).

Se encuentran publicados algunos trabajos referentes a la composición y las características del aceite esencial de *S. lavandulifolia*, aunque muy poco sobre la influencia del estado fenológico y las condiciones de cultivo de la planta sobre dicha composición y por consiguiente sobre su posible actividad farmacológica (Usano, 2012).

El objetivo de este trabajo de Tesis Doctoral ha sido evaluar la influencia de diferentes condiciones agronómicas y estado fenológico de la planta en la composición química de su aceite esencial y relacionarlo con el papel protector del aceite esencial de

*S. lavandulifolia* y de sus principales monoterpenos sobre células de sistema nervioso central.

Para ello, se han analizado diferentes muestras de aceite esencial de *S. lavandulifolia*, procedentes de dos cultivos experimentales diferentes realizado por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA). En el primero se ha estudiado la influencia del estado fenológico antes de la floración (al que se ha denominado **a.e. 1**) y en plena floración (**a.e. 2**); en el segundo se ha evaluado la influencia de la densidad de plantación (mayor densidad (**a.e. 3**) y menor densidad (**a.e. 4**)). Se ha determinado la composición química de las diferentes muestras, identificando y valorando sus principales componentes mediante cromatografía de gases, siendo los monoterpenos mayoritarios  **$\alpha$ -pineno, 1,8-cineol y alcanfor**.

A continuación, se ha estudiado el efecto protector de los aceites esenciales y de los principales monoterpenos aislados, frente al estrés oxidativo producido en un modelo *in vitro* inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y su relación con la respuesta antioxidante sobre cultivos de células nerviosas.

Las líneas celulares utilizadas han sido PC12 (proveniente de feocromocitoma de rata, que presenta las características de las neuronas dopaminérgicas) y U373-MG (procedente de glioblastoma de astrocitoma humano), que constituyen una potencial diana farmacológica para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, contribuyendo a la regulación del balance celular redox. Concretamente los astrocitos ejercen un efecto protector sobre las neuronas en condiciones de estrés oxidativo, sirviendo como apoyo estructural, trófico y metabólico (Maragakis & Rothstein, 2006; Shim et al., 2009). En la bibliografía científica se encuentran publicaciones sobre productos naturales que presentan un efecto protector (Halliwell, 1992), en células PC12 (Choi et al., 2010; Mo et al., 2012; Wu et al., 2012) y U373-MG (Elmann et al 2009; Steele & Robinson, 2012).

Los estudios de neuroprotección realizados en este trabajo sobre las dos líneas celulares citadas se han centrado principalmente en los efectos sobre los siguientes parámetros: viabilidad celular, citoprotección frente a estrés oxidativo, morfología celular, marcadores de estrés oxidativo (peroxidación lipídica y niveles GSH y GSSG) y actividad y expresión proteica de las principales enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GR, GPx y HO-1). Han tenido como objetivo determinar si existe una relación entre la composición del aceite esencial y su actividad farmacológica, además de intentar establecer cuáles son los compuestos responsables de esta actividad y su posible mecanismo de acción.

#### ▪ ESTUDIO FITOQUÍMICO

En primer lugar se ha realizado el estudio fitoquímico de los aceites esenciales de *S. lavandulifolia* obtenidos por destilación mediante arrastre en corriente de vapor de agua a partir de las especies de *S. lavandulifolia* recolectadas en campos experimentales de Aranjuez (Madrid) y Solsona (Lérida). El **rendimiento** en aceite esencial varía de forma importante dentro de la misma especie dependiendo tanto del estado fenológico, como de la densidad de plantación.

En este sentido, existen numerosos estudios sobre la influencia de los diferentes estadios de crecimiento y densidad de cultivo en el contenido y composición química de los aceites esenciales obtenidos de plantas de la familia Lamiaceae (*Walker et al., 2004; Angioni et al., 2006; Cases, 2006; Jordán et al., 2013*). Sin embargo, no hemos encontrado datos sobre *S. lavandulifolia*.

En el estudio realizado, estudio de la influencia del estado fenológico, la muestra **a.e. 1** procedente de las plantas recolectadas antes de la floración, presenta el menor rendimiento (1,54%) de todos los obtenidos, mientras que **a.e. 2**, proveniente de plantas recolectadas en plena floración, presenta el rendimiento más elevado (1,76%). En concordancia con estos resultados, estudios realizados por diversos autores en

diferentes especies de plantas aromáticas indican los mayores rendimientos se suelen alcanzar cuando la planta está en plena floración (Karamanos, 2000; Zrira et al. 2004; Cases, 2005; Zheljazkov et al., 2008; Abu-Darwish et al., 2012).

Respecto al estudio de la influencia de la densidad de plantación el aceite esencial obtenido del cultivo con menor distancia entre líneas (0,8 m), **a.e. 3**, presenta el rendimiento más elevado (2,57%). Estos resultados están en consonancia con otros previos que demuestran que el mayor rendimiento de aceite esencial se obtiene con un incremento en la densidad de plantación (Najafi & Moghadam, 2002; Khorshidi et al, 2009). Mientras que cuando la distancia entre líneas es mayor (1,2 m), **a.e. 4**, el rendimiento disminuye (1,84%).

Con respecto a la **composición química** de los aceites esenciales, la caracterización de los mismos realizada mediante cromatografía de gases, ha permitido observar diferencias cualitativas y cuantitativas entre las diferentes muestras (**Figura 75**).

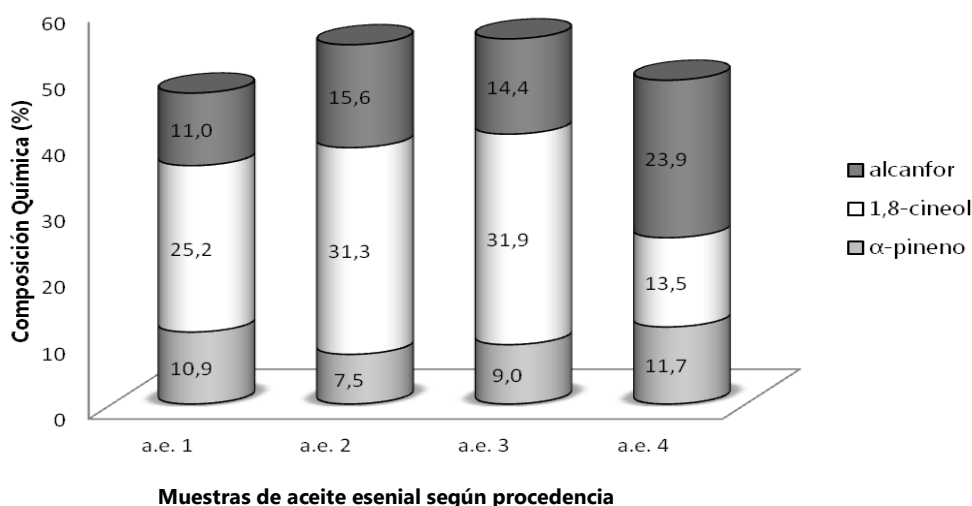
Todas presentan una riqueza apreciable en monoterpenos oxigenados que varía del 45,91% al 59,37%, mientras que los sesquiterpenos se encuentran presentes en porcentajes más bajos en las cuatro muestras de aceite esencial estudiadas (0,06-11,84%).

No todos los componentes químicos se encuentran en todas las muestras (por ejemplo:  $\beta$ -pineno, mirceno,  $\beta$ -felandreno o  $\alpha$ -terpineno), lo que permite comprobar la heterogeneidad de las muestras investigadas y la importancia de las determinaciones que relacionen los estudios de composición química con los de actividad farmacológica. En todas las muestras se han identificado 1,8-cineol,  $\alpha$ -pineno,  $\gamma$ -terpineno, alcanfor, borneol, canfeno y terpineol.

Hemos podido observar en el estudio notables fluctuaciones en la concentración de **1,8-cineol**: presentando mayor porcentaje en el momento de la floración de la planta (**a.e. 2**: 31,3%) y cuando la densidad de plantación es mayor (**a.e. 3**: 31,88%).

En cuanto a otro de los componentes mayoritarios, **alcanfor**, se ha detectado en mayor concentración en la muestra de aceite esencial procedente del cultivo con menor densidad de plantación, **a.e. 4** (23,85%).

**$\alpha$ -pineno** presenta un porcentaje de 10,9% en **a.e. 1**, antes de la floración y 7,52% en **a.e. 2**, durante la floración, observándose también variaciones según la distancia entre líneas es menor (8,99%), en **a.e. 3**, o mayor (11,67%), en **a.e. 4**.



**Figura 75. Composición del aceite esencial de las diferentes muestras de *S. lavandulifolia*.** Representación del porcentaje de los componentes mayoritarios que se encuentran en las cuatro muestras.

Los compuestos  $\beta$ -pineno y mirceno se detectan en **a.e. 1** y **a.e. 2** en concentraciones considerables. La concentración de  $\beta$ -pineno alcanza su mayor proporción en plena floración, coincidiendo con estudios previos realizados por Usano (2012); no ocurre lo mismo con el mirceno, cuya concentración en plena floración disminuye en las muestras analizadas en este estudio. Sin embargo, estos compuestos

están ausentes en las muestras **a.e. 3** y **a.e. 4**, mientras que ledol, d-terpineol y  $\beta$ -felandreno sólo están presentes en estas últimas.

Los estudios de composición química del aceite esencial de *S. lavandulifolia* recolectado en otras regiones de España, concuerdan con los resultados aquí reportados, aunque se encuentran pequeñas diferencias cualitativas y cuantitativas (Lawrence *et al.*, 1970; Crespo *et al.*, 1986; Marcos *et al.*, 1988; Guillén & Ibargoitia, 1995; Giannouli & Kintzios, 2000; Zrira *et al.*, 2004; Jordán *et al.*, 2009). Guillén y colaboradores (Guillén *et al.*, 1996) determinaron la presencia de alcanfor, 1,8-cineol y  $\alpha$ -tuyona como componentes principales en el aceite esencial de *S. lavandulifolia* obtenido de cultivos en la provincia de Zaragoza. En un estudio similar sobre *S. lavandulifolia* procedente de diferentes provincias de Castilla la Mancha (Cuenca, Albacete y Guadalajara), los autores identificaron el compuesto  $\beta$ -mirceno en todas las muestras (Herraiz-Peñalver *et al.*, 2010).

Esta variabilidad en la composición del aceite esencial de *S. lavandulifolia* recogida en diferentes regiones de España, sugiere la existencia de diferentes quimiotipos. Tal y como se ha indicado en estudios previos en otras especies (Tundis *et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2010) y como ha demostrado más recientemente Usano en *S. lavandulifolia* (Usano, 2012), donde revela una influencia principalmente genética sobre la composición química del aceite esencial.

Los resultados obtenidos del estudio del aceite esencial de *Salvia* española mediante el análisis por cromatografía de gases han permitido indicar la similitud de nuestros resultados con el perfil cromatográfico recogido en la Norma española UNE 84310: 2001 (AENOR, 2001), la cual fija los requisitos que debe cumplir un aceite esencial con el objeto de facilitar la apreciación de su calidad.

El perfil cromatográfico del aceite esencial consta de 11 compuestos determinados en la norma. El rango establecido en la mencionada Norma se compara

con el porcentaje de los obtenidos en cada una de nuestras muestras estudiadas (**Tabla 17**).

COMPONENTES	Aceite esencial en estudio	UNE 84310: 2001
<b><math>\alpha</math>-pineno</b>	7,5-11,7	4-11
<b>sabineno</b>	0-0,1	0,1-3
<b>limoneno</b>	0-3,4	2-5
<b>1,8-cineol</b>	13,5-31,9	11-30
<b>linalol</b>	0-0,5	0,3-4
<b>alcanfor</b>	11-23,9	15-36
<b>borneol</b>	0,1-3,7	1-5
<b>acetato de linalilo</b>	0-0,5	0,1-5
<b>acetato <math>\alpha</math>-terpenilo</b>	0-3	0,5-9
<b>acetato de sabinilo</b>	0-2,5	0,5-9

**Tabla 17. Composición de las muestras de *Salvia lavandulifolia* en estudio y la norma española UNE 84310/2001 (% de aceite esencial) (AENOR, 2001).**

La mayoría de los compuestos se encuentran dentro del rango especificado en la Norma; sin embargo, algunos compuestos no cumplen exactamente la misma, tal como indicamos a continuación.

El alcanfor es la excepción más clara de la norma, que está presente en concentraciones más bajas que lo que indican los estándares. No obstante, desde el punto de vista de su posible empleo terapéutico, este resultado puede ser de interés ya que muchos estudios confirman su actividad pro-oxidante.

En otro orden de cosas, es importante tener en cuenta la concentración de tuyonas, uno de los principales componentes del aceite esencial de *S. officinalis* y responsable de efectos neurotóxicos, como convulsiones (Tildesley *et al.*, 2003); este

compuesto se detecta en cantidades bajas en *S. lavandulifolia*, lo que también puede ser importante para su posible empleo en terapéutica.

En la literatura se han descrito diversos estudios sobre el aceite esencial de distintas especies de *Salvia* y se observan variaciones según su origen geográfico y etapa de crecimiento (Giannouli & Kintzios, 2000; Santos-Gomes & Fernandes-Ferreira, 2001; Amiri, 2007; Kamatou et al., 2008; Sajewicz et al., 2009). *S. lavandulifolia* presenta muy buena adaptación a las condiciones ambientales locales en muchas zonas del Mediterráneo (Bernáth & Németh, 2000). Sin embargo, existe una variabilidad intraespecífica en la composición química entre diferentes muestras de plantas (Jordán et al., 2009; Jordán et al., 2013) como hemos podido corroborar en nuestro estudio.

Los aceites esenciales son compuestos provenientes del metabolismo secundario de las plantas, cuyo rendimiento y composición química presenta un gran polimorfismo químico según los factores ambientales y las condiciones agronómicas en las que se encuentran (Giannouli & Kintzios, 2000; Panagiotopoulos et al., 2000; Farhat et al., 2001; Schmiderer et al., 2008; Ozturk et al., 2009).

Además, la selección del órgano, la proporción de tejido vegetal analizado, el tipo de metodología seguida para el análisis, la técnica de destilación y el método de secado influyen en la calidad del aceite esencial presente en las especies vegetales y en la proporción de sus componentes (Putievsky et al., 1986; Lahlou, 2004; Langa et al., 2009; Sajewicz et al., 2010).

Todo ello puede repercutir en la actividad del aceite esencial (Crespo et al., 1986; Vernin et al., 1986; Guillen et al., 1996; Perry NB et al., 1999; Karamanos et al., 2000; Santos-Gomes & Fernandes-Ferreira, 2001; Amiri, 2007; Papageorgiou et al., 2008; Kamatou et al., 2008; Giannouli & Kintzios, 2000; Ennajar et al., 2010; Herraiz-Peñalver et al., 2010; Ozkan et al., 2010). Por otra parte, bajo condiciones estresantes como alta



temperatura, baja fertilidad y sequía, las especies de *Salvia* producen aceites de alta calidad (Hay, 1993).

## ▪ ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA

### ▫ Capacidad antioxidante

Una vez realizados el estudio analítico de los cuatro aceites esenciales analizados se ha procedido al estudio de su actividad antioxidante. En primer lugar, se han valorado los efectos de las diferentes muestras sobre la **capacidad de absorción del radical oxígeno** (ORAC). La pérdida de fluorescencia en presencia de un generador de ROS, es un indicador de los daños producidos por el radical peroxilo (Cao *et al.*, 1993). Esta actividad se correlaciona con los constituyentes del aceite esencial de *S. lavandulifolia*. En el estudio se observa que las muestras de aceite esencial presentan una significativa capacidad antioxidante (0,3-0,8  $\mu\text{mol}$  Trolox/mg aceite esencial), tomando como referencia el Trolox, análogo hidrosoluble de la vitamina E.

Ante los resultados obtenidos, se decidió continuar el estudio a fin de determinar si alguno de los monoterpenos mayoritarios de este aceite esencial es responsable de su efecto antioxidante. Estudios previos de la actividad antiradicalaria realizados mediante métodos de DPPH, ORAC y radicales libres en sistemas *in vitro*, han identificado algunos monoterpenos como potentes captadores de radicales (Wang *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2012).

Los resultados con los monoterpenos aislados (1,8-cineol: 0,045;  $\alpha$ -pineno: 0,03 y alcanfor: 0,012 referidos a  $\mu\text{mol}$  Trolox/mg de compuesto respectivamente) muestran que los compuestos  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol presentan más capacidad captadora frente a radicales peroxilo derivados de AAPH, encontrados comúnmente en los procesos de

peroxidación lipídica; mientras que el alcanfor muestra una débil actividad como captador de radicales.

A raíz de estos resultados podemos deducir que los monoterpenos en estudio presentan menor capacidad antioxidante que el aceite esencial, pero similar a otros componentes activos de aceites esenciales utilizados en otros estudios (Wang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008). Entre los monoterpenos, 1,8-cineol es el que presenta mayor capacidad antioxidante, concordante con los resultados en diferentes estudios *in vitro* e *in vivo* en los que se ha observado mayor capacidad captadora de radicales libres, así como otras propiedades en el control del sistema de defensa antioxidante (Perry *et al.*, 2003; Ciftci *et al.*, 2011).

Lo anteriormente expuesto sugiere que la capacidad antioxidante del aceite esencial de *S. lavandulifolia* está determinada probablemente por la combinación de varios compuestos por interacciones sinérgicas. Es posible una actividad sinérgica de todos los componentes incluidos los que se encuentran en menor proporción, que aumente la capacidad antioxidante.

#### ▫ **Actividad protectora sobre líneas celulares PC12 y U373-MG en un modelo de estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Se ha recurrido a un modelo experimental *in vitro* para el estudio de la capacidad protectora frente al estrés oxidativo del aceite esencial y los monoterpenos mayoritarios que han demostrado mayor capacidad de absorción de radicales ( $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol). Se ha empleado como sustrato cultivos de neuronas (línea celular PC12) y de astrocitos (línea celular U373-MG) frente el estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Como paso previo al estudio de la capacidad protectora se determinó el efecto del pretratamiento con el aceite esencial y los monoterpenos aislados sobre la

**viabilidad de las dos líneas celulares** citadas, mediante el método de reducción del MTT a fin de establecer las concentraciones no tóxicas. Para ello se han determinado las condiciones óptimas de crecimiento y se han tratado las células con concentraciones crecientes de las muestras en estudio. Dichas concentraciones de aceite esencial comprenden un rango de 75 a 5  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que para los monoterpenos aislados ( $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol) es de 400 a 10  $\mu\text{M}$ . En el ensayo se observó que ninguno de los tratamientos (24 horas) resultó citotóxico ni alteró la viabilidad celular, a excepción de la concentración más alta de monoterpenos aislados.

Una vez determinadas las concentraciones que no afectan a la viabilidad de las células, el siguiente paso ha sido evaluar el **efecto citoprotector** que produce el pretratamiento con el aceite esencial y los diferentes monoterpenos frente a un modelo *in vitro* de estrés oxidativo inducido por  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Röhrdanz *et al.*, 2001; Chen & Swanson, 2003). Las concentraciones fueron establecidas en trabajos previos del grupo (Martín *et al.*, 2011; Martín *et al.*, 2013). La diferente concentración empleada responde al hecho de que las células PC12 son más sensibles a los efectos citotóxicos de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , debido probablemente a una mayor actividad de CAT y GPx, así como a un mayor nivel de moléculas antioxidantes como el GSH en astrocitos (Halliwell & Gutteridge, 1999).

La incubación con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , bajo las condiciones experimentales establecidas, causó una disminución significativa de la viabilidad celular, un 60%, frente a las células control. Cuando las células son pretratadas con las muestras del aceite esencial de *S. lavandulifolia* (75-5  $\mu\text{g/ml}$ ) y los monoterpenos  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol (100-10  $\mu\text{M}$ ), se produce una notable protección frente al daño oxidativo generado por el tóxico en las condiciones experimentales descritas, atenuando la pérdida de viabilidad y la muerte celular inducida en ambas líneas celulares.

Estos resultados están en concordancia con estudios previos realizados con el aceite esencial de otras especies de *Salvia*. Concretamente *S. fruticosa* presenta actividad protectora frente a muerte oxidativa inducida por  $\text{H}_2\text{O}_2$  en astrocitos,

indicando que  $\alpha$ -pineno es el componente que ejerce mayor acción protectora (Elmann *et al.*, 2009). Los estudios realizados indican que 1,8-cineol no evita la pérdida de la viabilidad celular en astrocitos al contrario que en los resultados que hemos obtenido.

A partir de estos resultados se seleccionaron las concentraciones más activas para proseguir el estudio, estas han sido para el aceite esencial 50 y 15  $\mu\text{g/ml}$  y para los monoterpenos 25 y 10  $\mu\text{M}$ .

Con el objetivo de confirmar estos resultados sobre células se ha realizado también el estudio sobre la **morfología celular** en ambas líneas celulares.

La disminución significativa de la viabilidad celular observada tras el tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  en ambos tipos de células se vio acompañada de cambios morfológicos marcados, incluidos la pérdida de su agrupación y la reducción de su tamaño, así como la disminución en el número de células, y en el caso de los astrocitos también disminución del número de ramificaciones que presentan. Cuando las células se pretrataron con el aceite esencial y los monoterpenos  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol, se observó una atenuación marcada de los cambios morfológicos negativos anteriormente descritos, provocados por el inductor de estrés oxidativo, lo que indica la protección que ejercen las muestras en estudio.

Una vez finalizados los ensayos de viabilidad y morfología celular, se continuó con el estudio de la **generación de ROS intracelular** inducida por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , cuantificando la capacidad de las muestras en estudio para impedir la formación de ROS y su capacidad de eliminar estas ROS en cultivos celulares mediante el ensayo de la diclorofluoresceína (DCFH-DA) (LeBel *et al.*, 1992).

Se han comparado los resultados con los obtenidos en las células control y con las células sometidas a estrés oxidativo inducido por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sin tratamiento previo. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  induce la formación de grandes cantidades de ROS intracelular de forma tiempo

dependiente, lo que sugiere que los resultados observados anteriormente en la viabilidad y morfología celular pueden estar relacionados con el aumento de la generación de ROS intracelular. Sin embargo, se observó una disminución de los niveles de ROS intracelular de forma significativa en las células pretratadas con el aceite esencial y con  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol. Ninguna de las muestras *per se* induce la producción intracelular de ROS, siendo los niveles de ROS producidos similares a los del control. Por tanto, estos resultados permiten afirmar que las muestras en estudio no son capaces de oxidar a la DCFH y por tanto de producir ROS.

En línea con lo anterior, la producción intracelular de ROS inducida por  $H_2O_2$  disminuye significativamente cuando las células son tratadas previamente con las muestras en estudio. El 1,8-cineol es el monoterpeno más activo, disminuyendo la producción de ROS entre un 30-45% a ambas concentraciones ensayadas (25 y 10  $\mu M$ ).

Se continuó el estudio determinando los **niveles de glutatión** oxidado (GSSG) y glutatión reducido (GSH), así como índice redox (IR), cociente GSSG/GSH, como indicador de daño oxidativo en el citosol.

El contenido de GSH (principal antioxidante no enzimático del organismo) en las células es un marcador de estrés oxidativo a tener en cuenta. La eficacia del sistema glutatión es mucho mayor en astrocitos que en neuronas, ya que la concentración de GSH es mayor (Maragakis & Rothstein, 2006).

Cuando las células se tratan con  $H_2O_2$  (30 min) disminuyen los niveles de GSH y aumentan los de GSSG, en comparación con las células control. Sin embargo, el pretratamiento durante 24 horas con las muestras de aceite esencial y los monoterpenos previo a la exposición a  $H_2O_2$ , previene las alteraciones ocasionadas por el mismo al aumentan el sistema antioxidante glutatión, modificando el Índice Redox, como resultado de un aumento de los niveles de GSH (Steele *et al.*, 2013). El efecto sobre los niveles de glutatión tanto del aceite esencial de *S. lavandulifolia* como de los

dos monoterpenos puede ser explicado por su capacidad moduladora de las enzimas glutatión GPx o GR, cuyo estudio se llevó a cabo a continuación.

Además, la actividad de las principales **enzimas antioxidantes** que aseguran el correcto funcionamiento de las defensas del organismo como catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y hemo-oxigenasa 1 (HO-1), se estudió mediante la determinación de los cambios en la actividad enzimática que se traducen en cambios en los niveles redox del organismo, constituyendo por tanto un marcador del estrés oxidativo a nivel celular.

Los resultados obtenidos muestran que la incubación durante 30 minutos de las líneas celulares en estudio, PC12 y U373-MG, con  $H_2O_2$  produce una significativa disminución de la actividad enzimática, lo que aumenta el riesgo de daño celular. El pretratamiento con las muestras de aceite esencial y los monoterpenos, produce un aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas evaluadas, comparado con las células expuestas únicamente a  $H_2O_2$ .

Estos datos sugieren que la disminución en la producción de ROS intracelular observada y anteriormente descritas, puede ser debida a la acción de *S. lavandulifolia* al actuar sobre los sistemas antioxidantes enzimáticos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en investigaciones previas (Zupkó *et al.*, 2001; Perry *et al.*, 2003; Asensio *et al.*, 2010).

En la segunda parte del estudio enzimático se determinó la **expresión proteica** de estas enzimas mediante la técnica de Western Blot en ambas líneas celulares. Se observó, al igual que ocurría en los estudios de actividad, una disminución en la expresión de las proteínas de las enzimas antioxidantes estudiadas después del tratamiento con  $H_2O_2$  en ambos casos.

En contraste, en las células pretratadas con las muestras de aceite esencial de *S. lavandulifolia*,  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol, la expresión de proteínas enzimáticas antioxidantes (CAT, SOD, GPx, GR, HO-1) se vio aumentada, ejerciendo un efecto protector frente al estrés oxidativo. Esta capacidad demostrada de modular el sistema enzimático endógeno por los aceites esenciales ha sido previamente descrito para otras especies de plantas (Zhang *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2012).

Una vez estudiadas las enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPx, GR, HO-1) se determina la expresión del **elemento de respuesta antioxidante Nrf2**, factor de transcripción celular que regula la expresión de estas enzimas, a fin de determinar la vía de señalización y posible mecanismo de acción. La vía Nrf2/Keap1-ARE controla la expresión de los genes implicados en las enzimas antioxidantes con potencial actividad citoprotectora. En condiciones basales, Nrf2 se encuentra inactivo por la unión de la proteína Keap 1 en el citoplasma. Sin embargo, la liberación de Nrf2 de Keap 1 inducida entre otras causas por estrés oxidativo, provoca que Nrf2 pase al núcleo dónde se une a elementos de respuesta antioxidante (ARE), que producen la activación de las enzimas antioxidantes citoprotectoras endógenas (Zhang *et al.*, 2007; Hamada *et al.*, 2011).

En la etapa final del presente trabajo, se han estudiado los efectos del aceite esencial de *S. lavandulifolia* y los compuestos  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol sobre la activación de la expresión del factor Nrf2 nuclear que resulta en la inducción de las enzimas antioxidantes estudiadas CAT, SOD, GPx, GR y HO-1. Se ha demostrado que el pretratamiento con las muestras, previo a la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, activa el factor nuclear Nrf2 en ambas líneas celulares. Este mecanismo se ha observado en estudios previos en los que se han identificado algunos monoterpenos activadores del factor Nrf2 en células del sistema nervioso (Jinyoung *et al.*, 2013).

A continuación, se realizó un estudio sobre la **peroxidación lipídica** celular, uno de los principales marcadores bioquímicos del estrés oxidativo, mediante el método de TBARS.

Los resultados de este estudio indican que la degradación oxidativa de los lípidos componentes de la membrana celular resulta mucho mayor en las células únicamente tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En cambio, las células pretratadas previamente durante 24 horas con las muestras objeto de estudio, aceite esencial y sus principales monoterpenos ( $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol), previo a la exposición al inductor de estrés oxidativo, presentaron menores niveles de peroxidación lipídica de forma estadísticamente significativa, lo que sugiere un efecto protector frente a la peroxidación de los lípidos de la membrana celular. Como consecuencia de estos resultados podemos afirmar que las muestras en estudio interactúan y penetran en la bicapa lipídica

Cabe destacar los resultados sobre la línea celular PC12 donde se observó una mayor protección frente a la peroxidación lipídica con el aceite esencial que con los monoterpenos aislados, y especialmente en las muestras de aceite esencial que presentaban mayor concentración de 1,8-cineol (**a.e. 1**, **a.e. 2** y **a.e. 3**).

Estos resultados están en concordancia con trabajos previos que muestran que los aceites esenciales de otras especies de Lamiaceae actúan como inhibidores efectivos de la peroxidación lipídica (Bozin *et al.*, 2006). Algunas especies del género *Salvia* como *S. officinalis*, *S. miltiorrhiza*, *S. candelabrum* y *S. ringens*, inhiben también la peroxidación lipídica (Hohmann *et al.*, 1999; Zhang & Chen, 1994; Zupkó *et al.*, 2001). Así mismo, se ha demostrado previamente que otros monoterpenos entre los que se incluye canfeno, acetato de geranilo y *p*-cimeno presentan propiedades antiperoxidación lipídica (Quintans-Júnior *et al.*, 2013).

Existe una fuerte relación entre la **apoptosis** producida por estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la degeneración de las células nerviosas como las neuronas y los



astrocitos (Maragakis & Rothstein, 2006). El  $H_2O_2$ , a altas concentraciones, es capaz de causar apoptosis en diferentes tipos de células incluidas las neuronas y los astrocitos (Singh et al., 2011), siendo la caspasa-3 un mediador enzimático clave en la apoptosis de forma que su inhibición contribuye a la protección celular frente al estrés oxidativo (Ozben, 2007).

En este apartado experimental, los resultados de este estudio indican una mayor actividad de la caspasa-3 en células únicamente tratadas con  $H_2O_2$ , mientras que las células pretratadas previamente con las muestras objeto de estudio, aceite esencial y los monoterpenos  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol, presentan una disminución en los niveles de caspasa-3 de forma estadísticamente significativa en comparación con las células tratadas con  $H_2O_2$ . Se aprecia por tanto, una protección frente a la apoptosis inducida por  $H_2O_2$ . Pudiendo afirmar incluso que el aceite esencial de *S. lavandulifolia* presenta un marcado efecto anti-apoptótico.

Cabe destacar la actividad sobre la línea celular U373-MG, dónde se observó una mayor inhibición de la caspasa-3 con el aceite esencial que con los monoterpenos aislados; destacando especialmente las muestras de aceite esencial con mayor concentración de 1,8-cineol. Esto puede ser debido, una vez más, a la actividad sinérgica de los componentes del aceite esencial.

El presente trabajo de **Tesis Doctoral** ha pretendido aumentar nuestro conocimiento sobre el papel del aceite esencial de *S. lavandulifolia* y sus monoterpenos mayoritarios,  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol, como reguladores del balance redox celular. Se ha demostrado experimentalmente, mediante técnicas *in vitro*, la actividad antioxidante y citoprotectora sobre las líneas celulares PC12 y U373-MG bajo condiciones de estrés oxidativo inducido por  $H_2O_2$ , demostrándose que las muestras en estudio presentan capacidad captadora de radicales, atenúan la pérdida de la viabilidad y los cambios morfológicos, inhiben la formación de ROS intracelular, aumentan la actividad y expresión del sistema antioxidante enzimático y del sistema glutatión, inhiben la

peroxidación lipídica y disminuyen la muerte celular al inhibir la activación de la caspasa-3, produciendo en su conjunto una clara protección de la neurodegeneración inducida por estrés oxidativo.

Los resultados demuestran que *S. lavandulifolia* protege frente a la muerte celular inducida por estrés oxidativo, esta acción se analiza al menos en parte por inducción de las enzimas antioxidantes a través de la activación de la vía Nrf2, potencial diana terapéutica para reducir el estrés oxidativo y proteger frente a enfermedades neurodegenerativas relacionadas con el estrés oxidativo, tal y como han descrito numerosos autores (*Van Muiswinkel et al., 2005; Erlank et al., 2011; Kumar et al., 2012*).

Se ha comprobado que el aceite esencial de *S. lavandulifolia* y los monoterpenos  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol pueden ser una importante fuente antioxidante natural, actuando como citoprotectores y antioxidantes. Proporcionando defensas contra el estrés oxidativo celular y previniendo el daño inducido por ROS que acompaña en algunas enfermedades neurodegenerativas, entre las que se incluyen la enfermedad de Alzheimer y de Parkinson.

Es interesante señalar, que los resultados obtenidos indican un mayor poder antioxidante para el aceite esencial que para los monoterpenos mayoritarios aislados, debido probablemente a una actividad sinérgica entre sus componentes. Esto ocurre en el caso del ensayo de la capacidad de absorción de radicales (ORAC), así como en la inhibición de la peroxidación lipídica analizada por TBARS y en la inhibición de la actividad de la caspasa-3.

Especialmente es destacable la actividad antioxidante de las muestras de aceite esencial con elevado contenido en **1,8-cineol** que corresponden a las muestras recolectadas en plena floración en el estudio de la influencia del estado fenológico (**a.e. 2**). Mientras que el estudio de la influencia de la densidad de plantación este contenido es mayor en la muestra obtenida del cultivo con mayor densidad de plantación (**a.e. 3**).

Podemos concluir así la importancia del uso del aceite esencial frente a los componentes aislados para uso farmacológico debido al sinergismo entre sus componentes. Si bien, el **1,8-cineol** es el componente que ha demostrado una mayor actividad. Por tanto, aquellos aceites esenciales que lo presentan en mayor proporción tienen una mayor actividad (*Ali & Blunden, 2003*).

# **CONCLUSIONES**



En el presente trabajo de Tesis Doctoral "Actividad neuroprotectora del aceite esencial de *Salvia lavandulifolia* Vahl." se ha llevado a cabo el estudio de la influencia del estado fenológico y la densidad de plantación de *Salvia lavandulifolia* sobre su composición química y sobre su posible actividad antioxidante. El estudio se ha realizado con el aceite esencial, obtenido por destilación de la planta, así como con sus monoterpenos mayoritarios ( $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol). Para ello se ha utilizado un modelo de estrés oxidativo inducido por  $H_2O_2$  en neuronas (línea celular PC12) y astrocitos (línea celular U373-MG).

De los resultados obtenidos en el desarrollo experimental se puede extraer las siguientes conclusiones:

▪ **Estudio fitoquímico**

1. El mayor rendimiento en aceite esencial se ha obtenido con las plantas procedentes del cultivo con mayor densidad de plantación (**a.e. 3**: 2,57%).
2. Las muestras en estudio presentan variabilidad en su composición química dependiendo del estado fenológico y de la densidad de plantación.
3. El aceite esencial presenta una riqueza apreciable en monoterpenos oxigenados que varía del 45,91% al 59,37%; destaca el elevado contenido en **1,8-cineol** (**a.e. 1**: 25,20%; **a.e. 2**: 31,30%; **a.e. 3**: 31,88%) y de **alcanfor** (**a.e. 4**: 23,85%).

▪ **Estudio farmacológico**

1. El aceite esencial de *S. lavandulifolia* (50 y 15  $\mu$ g/ml) y de sus monoterpenos  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol (25 y 10  $\mu$ M) ejercen un efecto protector frente al daño celular inducido por  $H_2O_2$  (0,1 mM línea celular PC12 y 1 mM línea celular U373-MG) que se manifiesta como:
  - Protección a nivel de la supervivencia celular.
  - Atenuación de los cambios en la morfología celular.

- Inhibición de la producción excesiva de ROS intracelular y de niveles de marcadores de la peroxidación lipídica.
  - Incremento de los niveles de GSH.
  - Incremento de la actividad y expresión de las principales enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPx, GR y HO-1).
2. La actividad protectora demostrada por el aceite esencial y los monoterpenos objeto de estudio  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol se debe, al menos en parte, a su capacidad para inducir la expresión del factor de transcripción eritroide-2 nuclear (Nrf2), el cual activa los genes responsables de la expresión de las enzimas antioxidantes.
  3. En todos los parámetros estudiados, el aceite esencial ha demostrado mayor actividad que los compuestos aislados.
  4. El efecto observado con los aceites esenciales es más marcado en aquellas muestras que contienen mayor porcentaje de 1,8-cineol.

A la vista de los resultados obtenidos en el estudio, podemos concluir que el aceite esencial de *S. lavandulifolia* y los monoterpenos  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol, presentan interés desde el punto de vista farmacológico, al ejercer mecanismos de protección antioxidante como reguladores del balance redox celular.

# SUMMARY





## INTRODUCTION

Reactive oxygen species (ROS) are potentially harmful products generated in the human body during normal cell aerobic respiration and metabolic process. Under physiological conditions, there is a balanced between ROS production and endogenous antioxidant defence systems activity (*Halliwell, 2003*). Nevertheless, this redox balance can be disturbed, resulting in an excessive production of ROS (i.e. hydroxyl radical, superoxide anion, hydrogen peroxide).

As a consequence of oxidative stress, ROS oxidize indiscriminately biological molecules, inducing lipid peroxidation, mitochondrial dysfunction, protein carbonilation and base's DNA damage, leading even to cell death (*Halliwell, 1992*).

Strong evidences support that an overproduction of ROS is implicated in aging processes as well as in the development of many diseases, including neurodegenerative diseases (*Valko et al., 2007; Mao, 2013*). The pathophysiology of many neurodegenerative diseases including Alzheimer's, Parkinson's, Amyotrophic lateral sclerosis, and Huntington's disease are related to ROS-induced oxidative cell damage (*Gandhi & Abramov, 2012*). High amounts of ROS levels as well as an imbalance in enzymatic system have been detected *in vitro*, *in vivo* studies and human post-mortem brain analysis from these patients (*Ramalingam & Kim, 2012*).

Over the last recent years, bioactive compounds with antioxidant properties have been considered as a promising approach to face the harmful effects of ROS. It has been recognized that the use of natural antioxidants may chemoprevent and protect the harmful and degradative effects free radical-induced in human body. Consequently, prevent oxidative injury or attenuate the progression of human diseases with protective agents in those central nervous system (CNS) disorders associated with oxidative stress is important (*Jaydeokar et al., 2012*). The use of exogenous antioxidants constitutes one

of the most promising therapeutic modalities to decrease the ROS-induced oxidative damage on cellular targets.

In this context, the use of essential oils with antioxidant activities may have beneficial effects on human health in the prevention and treatment of these common age-related diseases. Long time ago, aromatic plants began to use for food flavoring and medicinal purposes. Its essential oils contain variety complex of bioactive compounds, including monoterpenes, some of which have been reported to exhibit potential antioxidant properties utilizing in pharmaceutical industry (*Gonzalez-Burgos and Gómez-Serranillos, 2012*). Moreover, essential oils obtained from some Labiateae plants are used for its antioxidant properties to prevent or reduce ROS.

The genus *Salvia* (Lamiaceae family) is an important source of essential oils with a large and varied amount of phytochemicals which have been traditionally employed for its therapeutic properties (*Wei & Shibamoto, 2007*).

*Salvia lavandulifolia* Vahl., known as "Spanish sage", is an annual plant, native to the Iberian Peninsula, and it is widely distributed within East Spain, South France and North Africa. It is a small woody herbaceous perennial shrub up 17-100 cm with opposite, simple green or light grey leaves and flowers with a bright blue-purple color that grows preferably on the sandy-calcareous of mountainous Mediterranean area (at 350-2000 m) (*Hedge, 1972; Sáez, 2010*).

The aerial parts of *S. lavandulifolia*, which are rich in essential oils, are traditionally used as a main condiment for preserving food and as spice. Moreover, *S. lavandulifolia* has been commonly used in Mediterranean folk medicine for its spasmolytic, antiseptic, analgesic, sedative and antioxidant, among others properties. Furthermore, experimental studies have shown the potential value of *S. lavandulifolia* in the treatment of cognitive disorders associated with ageing attributed to its sedative, antioxidant, anti-inflammatory, oestrogenic and anticholinesterase activities (*Perry et al,*

2003). *S. lavandulifolia* Vahl. (Spanish sage) essential oil is a popular plant remedy widely used to improve the memory. Moreover, *S. lavandulifolia* essential oil has been previously reported as an important source of bioactive principles with potential natural antioxidant to prevent oxidative stress accompanying degenerative diseases (Tildesley *et al.*, 2003).

This specie contains numerous bioactive terpenes which may contribute to its effectiveness of CNS therapy. Monoterpenes contained in this essential oil (such as 1,8-cineole, camphor and  $\alpha$ -pinene) described in UNE 84310 (AENOR, 2001) are the main responsible for the described activities (Perry *et al.*, 2001; Savelev *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2007). Despite of available research concerning the chemical characterization and activities of *S. lavandulifolia* essential oil (Herraiz-Peñalver *et al.*, 2010), the role of its major monoterpenes as potential protective agents against oxidative damage at CNS level, the investigations available in the literature are scarce (Perry *et al.*, 2003).

Astrocytes are the major cell type in the central nervous system and they exert multiple key biological functions including physical, metabolic and nutritional support to neurons, regulation of its function, guide migration and protection to neurons. Because of the strong relationship between neurons and astrocytes, considerable attention has been paid to astrocytes as potential therapeutic targets in neurodegenerative diseases (Maragakis & Rothstein, 2006).

Previous works have demonstrated that the chemical composition and activity of *S. lavandulifolia* essential oils depend on external factors (i.e. vegetative cycle, environmental factors and cultivation practices) and internal factors (i.e. chemotype and biotype of the plant). Then the influence of phenological stages (vegetative and full flowering stages) and plant density conditions on chemical composition and antioxidant activity of *S. lavandulifolia* essential oils employing non cell-based and cell-based *in vitro* assays were investigated for the first time.

The antioxidant and cytoprotective role of essential oils of *S. lavandulifolia* and its main monoterpenes  $\alpha$ -pinene and 1,8-cineole against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in rat pheochromocytoma PC12 cells and human astrocytoma U373-MG cell line have been analyzed to examine their contribution as regulators of cellular redox balance. Furthermore, cell morphology, endogenous antioxidant enzymes protein expression and lipid peroxidation have been investigated.

The findings of this study contributes to the best knowledge of the Spanish sage as antioxidant medicinal plant for its used in human health.

## AIMS

Considering these facts, the objective of the present study was to analyze the chemical composition of *S. lavandulifolia* essential oil and to deepen on the potential relationship with its activity. In view of the importance of therapy research against oxidative stress induced-dementia and based on the traditional use of *S. lavandulifolia* essential oil, the aim of current work was conducted to evaluate and deepen on the protective effect of *S. lavandulifolia* essential oil and its major monoterpenes on neurons and astrocytes *in vitro*.

We have evaluated for the first time the compositional analysis and the cytoprotective role, based on the antioxidant properties, of different samples from Spain of *S. lavandulifolia* differing in phenological stage (vegetative and full flowering stages), plant density conditions (less and more distance between lines) and of its major compounds: the monoterpenes  $\alpha$ -pinene and 1,8-cineole.

The antioxidant capacity of the essential oil samples has been assessed by measuring diverse oxidative stress markers (i.e. lipid peroxidation, glutathione levels, enzymatic antioxidant system) and using rat pheochromocytoma PC12 and human astrocytoma U373-MG cells lines as *in vitro* cellular model and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as oxidative

damage inductor. We have studied if the protective effect of these samples has been mediated, at least in part, by inducing the expression of the transcription factor nuclear erythroid-2 (Nrf2).

Furthermore, we have evaluated the antioxidant properties of the main components of *S. lavandulifolia* essential oil: 1,8-cineole, camphor and  $\alpha$ -pinene. This study contributes to the best knowledge of the Spanish sage as antioxidant medicinal plant for its used in food industry and in human health.

## RESULTS

### ▪ **Phytochemical analysis**

*S. lavandulifolia* essential oil was obtained by hydrodistillation of the aerial parts of the plant obtaining a light yellow liquid with a characteristic smell. First of all we have examined how phenological stages (vegetative and full flowering stages) and plant density (more and less distant between lines) may influence in *S. lavandulifolia* essential oil chemical composition. The essential oil obtained from the aerial parts of *S. lavandulifolia* was characterized by a yield (% w/w) between 1.54% and 2.57%. The highest oil yield (2.57%) was obtained from plants with distant between lines of 0.8 m (**a.e. 3**). These results are in accordance with previous studies that showed the higher total yield of essential oil was obtained with the increasing in plant density (*Najafi & Moghadam, 2002; Khorshidi et al., 2009*). Furthermore, the essential oil yield was 1.75% for full flowering sample. As *Zrira et al. (2004)* and *Kargiolaki et al. (1994)* reported previously, the highest oil yield was obtained during the flowering period for plants growing in warmer and dried regions (*Karamanos et al 2000; Zrira et al., 2004*).

The gas chromatographic analysis of the essential oil of *S. lavandulifolia* identified the presence of a total of 28 and 27 compounds in each investigated studies, which

account of identified compounds higher 86% in all samples. Analysis of the essential oils samples revealed quantitative variability of components. The dominant compounds in the essential oils were oxygen containing monoterpenes, such as 1,8-cineole or camphor. Hydrocarbons monoterpenes, such as  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene and  $\beta$ -phellandrene; and sesquiterpenes (oxygenated and hydrocarbons) were present in low percentage in essential oil samples.

In particular, the 1,8-cineole content was higher in flowering stage and high-density plantations. On the other hand, the percentage of camphor was higher in low-density plantations. Moreover, it is remarkable that the compound thujone was detected in very small amounts in all samples.

These results are in agreement with previous works on chemical composition of *S. lavandulifolia* essential oil collected in other regions of Spain. However, some qualitative and quantitative differences were found. Guillén and colleagues (Guillén *et al.*, 1996) reported the presence of camphor, 1,8-cineole and  $\alpha$ -thujone as main components in the *S. lavandulifolia* essential oil from Zaragoza. In other similar study on *S. lavandulifolia* from different regions of Castilla la Mancha, the authors identified the compound  $\beta$ -myrcene in all samples (Herraiz-Peñalver *et al.*, 2010); this constituent was not detected in all essential oil of our plant samples. This variety in compounds reported for *S. lavandulifolia* from different Spanish regions suggests the existence of chemotypes of its essential oils.

Comparing our results of essential oil composition with the Spanish standard UNE 84310 (2001), almost all the compounds were found in the range of variation. Camphor was an exception, identified in lower concentrations than in standards, which may be positive since camphor has been reported as a prooxidant compound.

Many previous reports have indicated that the chemical composition of essential oils may be significantly affected by various environmental and genetic factors (Tundis

*et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2010). The stage of plant development, the geographical location, the harvest frequency, the plant variety and genotype and the climatic conditions are factors that determine the essential oil content and quality (Panagiotopoulos *et al.*, 2000a; Jordán *et al.*, 2009), and consequently the antioxidant activity (Guillén *et al.*, 1996; Herraiz-Peñalver *et al.*, 2010).

▪ **Pharmacological activity**

The essential oil samples exhibited a potential antioxidant capacity by ROS scavenging, enhancing the endogenous antioxidant system and inhibiting lipid peroxidation in a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress model in neurons and astrocytes.

○ **Antioxidant capacity**

Peroxyl radicals are major oxidative products occur during lipid peroxidation in biological models. The antioxidant activity was evaluated by measuring the peroxyl-radical scavenging capacity using Oxygen radical absorbance activity (ORAC) method (Prior *et al.*, 2005). The ORAC method is a common and valuable assay that employs a biological relevant radical source to estimate the antioxidant activity of individual compounds and essential oils (Dávalos *et al.* 2004).

To deepen the study of the antiradical activity, we investigated the potential radical scavenging capacity of essential oil main monoterpenes ( $\alpha$ -pinene, 1,8-cineole and camphor). The highest ORAC value was for essential oils and 1,8-cineole with more activity of three monoterpenes.

This scavenger activity and properties on the modulation of the antioxidant defence system have been reported for 1,8-cineole in different *in vitro* and *in vivo* studies (Perry *et al.*, 2003; Ciftci *et al.*, 2011). Studies on antiradical activity in *in vitro*



system have identified several monoterpenes as potent radical scavengers (Wang *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2012). However, our findings suggest that essential oils samples of *S. lavandulifolia* were more effective scavengers against AAPH-derived peroxy radicals than isolated compounds alone.

Considering these results, we further evaluated the antioxidant and cytoprotective responses of essential oils of *S. lavandulifolia* and monoterpenes with higher antioxidant capacity ( $\alpha$ -pinene and 1,8-cineole) to  $H_2O_2$ -induced oxidative stress in neurons and astrocytes.

- Protective activity

In the current work we have evaluated, for the first time, the protective properties of *S. lavandulifolia* essential oils and its main monoterpenes from  $H_2O_2$ -induced oxidative stress using culture neurons and astrocytes as cellular model.

First of all, the effects of essential oils of *S. lavandulifolia* and  $\alpha$ -pinene and 1,8-cineole on cell viability were investigated using the MTT reduction assay. We established the range of concentrations which did not result cytotoxic for cells and did not decrease cell viability as compared to control cells. The essential oil samples (50 to 5  $\mu$ g/ml) and monoterpenes (100 to 10  $\mu$ M) did not exhibit cytotoxicity was determined.

Therefore, we have investigated the potential cytoprotective effect. For this purpose a model of  $H_2O_2$ -induced oxidative stress in cells has been employed.

Hydrogen peroxide, which is the major ROS in the human body, has been physically characterized by its stability and its easily capacity to diffuse across cell membranes. Hydrogen peroxide is involved in different ROS-inducing reactions; these produced ROS cause the oxidative degradation of membrane lipids and alterations in

antioxidant enzyme expression in astrocytes (Röhrdanz *et al.*, 2001; Chen & Swanson, 2003).

We observed that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 min, 0.1 mM to PC12 and 1 mM to U373-MG) decreased cell viability over 60% compared with control cells (100%). However, the cellular pretreatment with all assayed concentrations of samples increased significantly cell viability as compared with cells treated only with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, exhibiting that essential oil of *S. lavandulifolia* and its main isolated monoterpenes exert a protective effect against ROS damage.

The results of the present study agree with the results of previous works (Elmann *et al.*, 2009) who have demonstrated the potential astroprotective activity from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative death of essential oils extracted from other *Salvia* sp. (*S. fruticosa*). In agreement with our results, Elmann *et al.* (2009) found that  $\alpha$ -pinene was the most protective active compound among various constituents of *S. fruticosa* essential oil against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced astrocytic cell death. In other previous studies, it has been demonstrated that 1,8-cineole, acting as antioxidant, protect different human cell types against ROS-mediated genotoxicity (Mitic-Culafic *et al.*, 2009).

To confirm the cytoprotective activity the effect on cell morphology has been investigated. As a consequence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure modified cell morphology including a decrease in cell number and marked changes in astrocytic morphology including loss of ramifications and round and makes smaller the body have been observed. However, the pretreatments with essential oils and monoterpenes markedly attenuated changes in cells morphology, supporting the potential protective role of *S. lavandulifolia* against the oxidative damage H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced.

Next, we determine the effect of essential oil of *S. lavandulifolia* and  $\alpha$ -pinene and 1,8-cineole on intracellular ROS production using 2',7'-dichlorfluorescein-diacetate (DCFH-DA) method. In presence of oxidant compounds such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the non-

fluorescence compound DCFH is oxidized to fluorescent DCF, being the fluorescence intensity directly proportional to ROS produced in cells (LeBel *et al.*, 1992). The levels of intracellular ROS after treatments with our samples were similar to the control. These results demonstrate that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> significantly increased the generation of ROS in cells. However, nor essential oil neither monoterpenes *per se* are able to oxidize DCFH, and therefore to produce ROS. On the other hand, the data show that intracellular ROS production induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> significantly declined when cells were pretreated with samples.

Then, we examined the effect of essential oils of *S. lavandulifolia* on glutathione levels. The reduced-type glutathione (GSH) acts as a potent endogenous antioxidant compound. The ratio between the oxidized-type and reduced-type glutathione levels is often used as indicative of the cellular reducing power (Schulz *et al.*, 2000). Redox Index GSH/(GSSG + GSH) was increased in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells than in control cells due to a decrease in GSH level and increase GSSG level compared with control cells. However, when cells were pretreated with essential oil for 24 h, and after incubated with the oxidative stress inductor, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the Redox Index (GSSG/GSH+GSSG) decreased as result of an increase on GSH levels. This may be explained by its ability to modulate the glutathione enzymes GPx or GR.

Effects of essential oils of *S. lavandulifolia* on enzymatic activity and expression in cultured cells were measured by spectrophotometric methods and Western blot, respectively.

The induction of main antioxidant enzymes such as CAT, SOD, GR, GPx and HO-1 are among the described mechanisms through which essential oils may prevent and protect cell from ROS-induced oxidative stress damage. The modulation of these enzymes constitutes a key target to counteract ROS-mediated damage (Zhang *et al.*, 2007). CAT catalyzes the decomposition of hydrogen peroxide, SOD catalyzes the dismutation of the superoxide anion radical, HO-1 catalyzes the oxidative heme

degradation and GPx catalyzes the reduction of hydroperoxides in a reaction coupled with GR (Krishnamurthy & Wadhwani, 2012). Therefore, we further investigate the effect of essential oils of *S. lavandulifolia* on activity and protein expression of these enzymes.

A marked decrease in the activity and protein expression of the studied antioxidant enzymes in cells after treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has been observed as compared to control cells. In contrast, enzymatic activity and protein expression were significantly increased by the pretreatment of cells with samples for 24 h prior to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposition. Thus, these findings suggest that the essential oil of *S. lavandulifolia* exert a protective effect against oxidative stress by increasing activity and protein expression of antioxidant enzymes. The ability to modulate the endogenous enzymatic system by essential oils has been previously described for other plant species (Li *et al.*, 2012).

Besides, *S. lavandulifolia* essential oil and monoterpenes activated the nuclear factor Nrf2 that result in the induction of the studied antioxidant enzymes CAT, SOD, GPx, GR, and HO-1. The Nrf2/Keap1-ARE signaling pathway controls the expression of genes involved in antioxidant enzymes with potential cytoprotective activity. The induction of the expression of the genes encoding for antioxidant and detoxifying enzymes is regulated by the transcription factor Nrf2 (Ma & He, 2012).

Under normal conditions, Nrf2 is bound to Keap1 and retained in cytoplasm. In presence of activating compounds including stimuli of oxidative stress, electrophilic compounds and chemopreventive agents, Nrf2 migrates to the nucleus and activate antioxidant response elements (ARE)-regulated genes, and subsequent presumably enhance the expression of endogenous cytoprotective enzymes (Zhang *et al.*, 2007).

Because many studies involve Nrf2 factor in the expression of the antioxidant enzymes CAT, SOD, GPx, GR and HO-1, we further evaluated the effect of samples on the Nrf2 signaling pathway. Consistent with other results that have identified several monoterpenes as activators of Nrf2 factor in nervous system cells (Jinyoung *et al.*,

2013), the present work demonstrate that pretreatments with *S. lavandulifolia* essential oils and monoterpenes 1,8-cineole and  $\alpha$ -pinene, prior to  $H_2O_2$  exposure, resulted in increase of nuclear Nrf2 factor. Thus, these findings suggest that these essential oils and monoterpenes samples, at least in part, exert a protective effect against  $H_2O_2$  in cells by inducing Nrf2 factor.

The oxidative degradation of lipids in cell membranes, one of the major biochemical markers of oxidative stress, is involved in the pathophysiology of CNS injury (Halliwell, 1992). Effects of essential oils of *S. lavandulifolia* and main monoterpenes on oxidative stress parameters in cultured cells have been studied. The antilipid peroxidative property has previously been demonstrated for other monoterpenes including camphene, geranyl acetate and *p*-cymene (Quintans-Júnior *et al.*, 2013).

Malondialdehyde (MDA), end-products of lipid peroxidation and a common oxidative stress marker, has been detected in increased levels in brains of patients suffered from free radical-related neurodegenerative diseases (Molina *et al.*, 1992; Dib *et al.*, 2002). The effect of *S. lavandulifolia* essential oil on lipid peroxidation was screened and monitored using the TBARS method. The thiobarbituric acid reacts with MDA resulting in a colored derivative compound detected spectrophotometrically (Mihara & Uchiyama, 1978).

TBARS levels in cells were significantly higher in  $H_2O_2$ -treated cells. However,  $H_2O_2$ -induced lipid peroxidation was significantly reduced by *S. lavandulifolia* essential oils and main monoterpenes pretreatments. Our data support the reported previous findings on the antiperoxidative potential protective role of *Salvia* spp.

These findings suggest that tested essential oils samples mainly prevent oxidative stress by inhibiting the lipid peroxidation. These results are in accordance with previous works that showed essential oils of other *Lamiaceae* species act as effective inhibitors of

lipid peroxidation (Bozin *et al*, 2006). Previous works have demonstrated that *S. officinalis*, *S. miltiorrhiza*, *S. candelabrum* and *S. ringens*, among others, act as active medicinal plants in inhibiting lipid peroxidation (Zhang & Chen, 1994; Hohmann *et al*, 1999; Zupkó *et al*, 2001).

Finally, oxidative stress may lead to cell death; mainly inducing apoptosis (programmed cell death). Hydrogen peroxide, at high concentrations, has the ability to cause apoptosis in different cell types including neurons and astrocytes (Singh *et al*, 2011). There is a strong relationship between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis via oxidative stress and the degeneration of cells (Maragakis & Rothstein, 2006). Therefore, the activity of caspase-3, the major effector enzyme involved in apoptotic pathways, was evaluated.

Accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative injury to lipids, nucleic acids and proteins can trigger apoptosis as common cell death mechanism. Caspase-3 is a key enzymatic mediator in external and internal apoptosis pathways. The direct suppression of active caspase-3 contributes to the cellular protection against oxidative stress (Ozben, 2007). Caspase-3 activity is increased in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells as compared to control cells. Pretreatment with essential oil and monoterpenes samples inhibited caspase-3 activation. A significant decrease in caspase-3 activity was observed when cells were pretreated with essential oils samples, suggesting these findings that *S. lavandulifolia* essential oils has a marked anti-apoptotic effect.

These results suggest that pretreatments with *S. lavandulifolia* essential oil and its main monoterpenes exerted an important cytoprotective effect against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative model in neurons and astrocytes by attenuating loss of cell viability and recovering changes in cell morphology, inhibiting intracellular ROS production, lipid peroxidation and caspase-3 activation and increasing the endogenous antioxidant status (glutathione levels and CAT, SOD, GR, GPx and HO-1 activity and protein expression). Furthermore, these samples induce Nrf2 nuclear translocation and

scavenge ROS. And provide *in vitro* scientific support for the use of this plant in traditional medicine.

On the basis of these results, *S. lavandulifolia* essential oils as antioxidants are of interest for its use for human health purposes maintaining the redox balance. The marked effectiveness in antioxidant properties of *S. lavandulifolia* essential oils make them an important natural antioxidant source with beneficial role on the prevention of pathophysiology of many diseases and a potential candidate on the prevention and treatment of oxidative stress-associated neurodegenerative diseases including Alzheimer's and Parkinson's diseases.

## CONCLUSIONS

The present Doctoral Thesis "Neuroprotective activity of *Salvia lavandulifolia* Vahl. essential oil" focused on the study of the influence of growth stage and planting density on *Salvia lavandulifolia* chemical composition and on its possible antioxidant activity. The study was conducted with the essential oil obtained by plant distillation and with its major monoterpenes ( $\alpha$ -pinene and 1,8-cineole). For this purpose a  $H_2O_2$ -induced oxidative stress model in neurons (cell line PC12) and astrocytes (cell line U373-MG) was employed.

The following conclusions can be drawn from the present study:

- **Phytochemical study**

1. The highest essential oil yield was obtained with plants cultivated at higher planting density (ae 3: 2.57%).
2. The samples used show variability in chemical composition depending on the growth stage and the planting density.

3. The essential oil is significantly rich in oxygenated monoterpenes ranging from 45.91% to 59.37%; it highlights the high content in 1,8-cineole (ae 1: 25.20%; ae 2: 31.30%; ae 3: 31.88%) and camphor (ae 4: 23.85%).

▪ **Pharmacological Study**

1. *S. lavandulifolia* essential oil (50 and 15 µg / ml) and its monoterpenes α-pinene and 1,8-cineole (25 and 10 µM) exerted a protective effect against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell damage (0.1 mM PC12 cell line and 1 mM U373-MG) manifested as:
  - Protection on cell viability.
  - Attenuation in cell morphology changes.
  - Inhibition of intracellular ROS overproduction and lipid peroxidation markers.
  - Increase in the levels of GSH.
  - Increase in the activity and expression of main antioxidant enzymes (CAT, SOD, GPx, GR and HO-1).
2. The demonstrated protective activity exerted by the essential oil and its monoterpenes α-pinene and 1,8-cineole is due at least in part to its ability to induce the expression of the erythroid transcription factor nuclear-2 (Nrf2) which activates genes responsible for the expression of antioxidant enzymes.
3. In all parameters studied, the essential oil has shown greater activity than the isolated compounds.
4. The observed effect is more marked for those essential oils samples that contain a higher percentage of 1,8-cineole.

In view of the results obtained in the study, we conclude that the *S. lavandulifolia* essential oil and its monoterpenes α-pinene and 1,8-cineole, are interesting from a pharmacological point of view, because they exert antioxidant protection mechanisms as regulators of cellular redox balance.





# **BIBLIOGRAFÍA**



- Abascal K, Yarnell E. Alzheimer's Disease: part 1 (biology and botanicals). *Alternat Complement Ther*, 2004a; 10:18-21.
- Abascal K, Yarnell E. Alzheimer's Disease: part 2 (a botanical treatment plan). *Alternat Complement Ther*, 2004b; 10:67-72.
- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*, 2006; 7:41-53.
- Abraham NG, Kappas A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev*, 2000; 60:79-127.
- Abu-Darwish MS, Alu'datt MH, Al-Tawaha AR, Ereifej K, Almajwal A, Odat N, Al Khateeb W. Seasonal variation in essential oil yield and composition from *Thymus vulgaris* L. during different growth stages in the south of Jordan. *Nat Prod Res*, 2012; 26:1310-7.
- Adams M, Gmunder F, Hamburger M. Plants traditionally used in age related brain disorders-A survey of ethnobotanical literature. *J Ethnopharmacol*, 2007; 113:363-381.
- Aebi H. Catalase *in vitro*. *Meth Enzymol*, 1984; 105:121-126.
- AENOR. Norma Española UNE 84310, Aceite esencial de Salvia de España (*Salvia lavandulifolia* Vahl). Asociación Española de Normalización y Certificación. Aceites esenciales. 2001, Madrid.
- Akhondzadeh S, Noroozian M, Mohammadi M, Ohadinia S, Jamshidi AH, Khani M. *Salvia officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebo-controlled trial. *J Clin Pharm Ther*, 2003; 28:53-59.
- Ali BH, Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytother Res*, 2003; 17:299-305.
- Allaman I, Belanger M, Magistretti PJ. Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends Neurosci*, 2011; 34:76-87.
- Amiri H. Quantitative and qualitative changes of essential oil of *Salvia bracteata* Bank et Sol. in different growth stages. *DARU*, 2007; 15:79-82.
- Angioni A, Barra A, Coroneo V, Dessi S, Cabras P. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. spp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *J Agric Food Chem*, 2006; 54:4364-4370.
- Anthos. Sistema de información sobre las plantas en España. *Real Jardín Botánico*, 2006-2012. [www.anthos.es](http://www.anthos.es)
- Araque A. Astrocytes process synaptic information. *Neuron Glia Biol*, 2008; 4:3-10.
- Aruoma OI. Assessment of potential prooxidant and antioxidant actions. *J Am Chem. Soc*, 1996; 73:1617-1625.
- Asensio S, Manzanera MC, Martín H, Sanz MA, Herrero B. Antioxidant activity of *Lavandula latifolia*, *Salvia lavandulifolia* and *Thymus mastichina* collected in Spain. *XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): A New Look at Medicinal and Aromatic Plants Seminar*, 2010; 925:281-290.
- Astani A, Reichling J, Schnitzler P. Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils. *Phytother Res*, 2009; 24:673-9.

- Axelsen PH, Komatsu H, Murray IV. Oxidative stress and cell membranes in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Physiology (Bethesda)*, 2011; 26:54-69.
- Badi HN, Yazdani D, Ali SM, Nazari F. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. *Ind Crops Prod*, 2004; 19:231-236.
- Bains JS, Shaw CA. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress mediated neuronal death. *Brain Res Rev*, 1997; 25:335-358.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils- A review. *Food Chem Toxicol*, 2008; 46:446-475.
- Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002; 99:16093-16098.
- Baricevic D, Bartol T. The biological/pharmacological activity of the *Salvia* genus. Sage: the genus *Salvia*. Medicinal and Aromatic Plants. Kintzios, SE (Ed). Harwood Academic Publishers, Amsterdam. 2000; 14:143-184.
- Barja de Quiroga G, Pérez-Campo R, López M. Anti-oxidant defences and peroxidation in liver and brain of aged rats. *Biochem J*, 1990; 272:247-250.
- Barreto GE, González J, Torres Y, Morales L. Astrocytic-neuronal crosstalk: implications for neuroprotection from brain injury. *Neurosci Res*, 2011; 554:107-113.
- Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of ageing matures. *Physiol Rev*, 1998; 78:547-581.
- Bélanger M, Magistretti PJ. The role of astroglia in neuroprotection *Dialogues Clin Neurosci*, 2009; 11:281-295.
- Bell KF, Al-Mubarak B, Fowler JH, Baxter PS, Gupta K, Tsujita T, Chowdhry S, Patani R, Chandran S, Horsburgh K, Hayes JD, Hardingham GE. Mild oxidative stress activates Nrf2 in astrocytes, which contributes to neuroprotective ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011; 108:E1-2.
- Belletti N, Kamdem SS, Tabanelli G, Lanciotti R, Gardini F. Modeling of combined effects of citral, linalool and  $\beta$ -pinene used against *Saccharomyces cerevisiae* in citru-based beverages subjected to a mild heat treatment. *Int J Food Microbiol*, 2010; 136:283-289.
- Belonogov RN, Titova NM, Lapeshin PV, Ivanova YR, Shevtsova AO, Pokrovskii AA. Changes in the content of protein and lipid oxidative modification products in tumor tissue at different stages of lung cancer. *B Exp Biol Med*, 2009; 147:630-631.
- Ben Achour S, Pascual O. Astrocyte-Neuron Communication: Functional Consequences. *Neuroch Res*, 2012, DOI: 10.1007/s11064-012-0807-0.
- Benarroch EE. Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system. *Mayo Clin Proc*, 2005; 80:1326-1338.
- Beretta G, Artali R, Maffei Facino R, Gelmini F. An analytical and theoretical approach for the profiling of the antioxidant activity of essential oils: the case of *Rosmarinus officinalis* L. *J Pharm Biomed Anal*, 2011; 55:1255-1264.
- Bergendi L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci*, 1999; 65:1865-1874.
- Bernáth J, Németh E. Genetic improvement of cultivated species of the genus *Salvia*. Kintzios, SE (Ed). Sage. The Genus *Salvia*. Amsterdam: Harwood Academic Publisher, 2000, 109.

- Biesalski HK, Hemmes C, Hopfenmuller W, Schmid C, Gollnick HP. Effects of controlled exposure of sunlight on plasma and skin levels of beta-carotene. *Free Radic Res*, 1996; 24:215-224.
- Blanc EM, Bruce-Keller AJ, Mattson MP. Astrocytic gap junctional communication decreases neuronal vulnerability to oxidative stress-induced disruption of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and cell death. *J Neurochem*, 1998; 70:958-970.
- Blumenthal, Goldberg, Brinckmann. Herbal Medicine Expanded Commission E Monographs. *American Botanical Council*, 2000; 330-334.
- Bozin B, Mimica-Dukic N, Simin N, Anackov G. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J Agric Food Chem*, 2006; 54:1822-1828.
- Browne SE, Beal MF. Oxidative damage in Huntington's disease pathogenesis. *Antioxid Redox Signal*, 2006; 8:2061-2073.
- Bruneton J. Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales. 2ª Ed. Zaragoza. Editorial ACRIBIA, 2001; 477-570.
- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int J Food Microbiol*, 2004; 94:223-253.
- Burton GW, Ingold KU, Cheeseman KH, Slater TF. Application of deuterated alpha-tocopherols to the biokinetics and bioavailability of vitamin E. *Free Radical Res Com*, 1990; 11, 99-107.
- Burton GW, Ingold KU. Vitamin E as an *in vitro* and *in vivo* antioxidant. *Ann NY Acad Sci*, 1989; 570:7-22.
- Cajal SR. Sobre un nuevo proceder de impregnación de la neuroglia y sus resultados en los centros nerviosos del hombre y de los animales. *Trab Lab Inves Biol Madrid*, 1913; 14:155-62.
- Calabrese V, Guagliano E, Sapienza M, Panebianco M, Calafato S, Puleo E, Pennisi G, Mancuso C, Butterfield DA, Stella AG. Redox regulation of celular stress response in aging and neurodegenerative disorders: role of vitanges. *Neurochem Res*, 2007; 32:757-773.
- Campos HC, da Rocha MD, Viegas FP, Nicastro PC, Fossaluzza PC, Fraga CAM, Barreiro EJ, Viegas C. The role of natural products in the discovery of new drug candidates for the treatment of neurodegenerative disorders I: Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2011; 10:239-250.
- Cañigueral S, Iglesias J, Hamburger M, Hostettmann K. Phenolic constituents of *Salvia lavandulifolia* ssp. *lavandulifolia*. *Planta Med*, 1989; 55:92.
- Cañigueral S, Vila R, Wichtl M. Plantas Medicinales y drogas vegetales para infusión y tisana. *OEMF International*, 1998; 467-472.
- Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Rad Biol Med*, 1993; 14:303-311.
- Cardile V, Russo A, Formisano C, Rigano D, Senatore F, Arnold NA, Piozzi F. Essential oils of *Salvia bracteata* and *Salvia rubifolia* from Lebanon: Chemical composition, antimicrobial activity and inhibitory effect on human melanoma cells. *J Ethnopharmacol*, 2009; 126:265-272.

- Carnesecchi S, Schneider Y, Ceraline J, Duranton B, Gosse F, Seiler N, Raul F. Geraniol, a component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001; 298:197-200.
- Carnevali S, Petruzzelli S, Longoni B, Vanacore R, Barale R, Cipollini M, Scatena F, Paggiaro P, Celi A, Giuntini C. Cigarette smoke extract induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts. *Am J Physiol*, 2003; 284:L955-963.
- Cases MA. Estudio comparativo de los aceites esenciales de dos especies del género *Origanum*. Tesis Doctoral. *Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid*, 2005.
- Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004; 24:816-823.
- Cha JD, Kim YH, Kim JY. Essential oil and 1,8-cineole from *Artemisia lavandulaefolia* induces apoptosis in KB cells via mitochondrial stress and caspase activation. *Food Sci Biotechnol*, 2010; 19:185-191.
- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 1979; 59:527-605.
- Chang H, Kim HJ, Chun HS. Quantitative structure-activity relationship (QSAR) for neuroprotective activity of terpenoids. *Life Sci*, 2007; 80:835-841.
- Cheeseman KH. Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Mol Aspects Med*, 1993; 14:191-197.
- Chen W, Viljoen AM. Geraniol- A review of a commercially important fragrance material. *S African J Bot*, 2010; 76:643-651.
- Chen Y, Swanson RA. Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003; 23:137-149.
- Cherniak C. The bounded brain. *J Cogn Neurosci*, 1990; 2:58-68.
- Choi D, Lee Y, Hong JT, Lee H. Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for Alzheimer's disease. *Brain Res Bull*, 2012; 87:144-153.
- Choi J, Rees HD, Weintraub ST, Levey AI, Chin LS, Li L. Oxidative modifications and aggregation of Cu,Zn-superoxide dismutase associated with Alzheimer and Parkinson diseases. *J Biol Chem*, 2005; 280:11648-11655.
- Choi RC, Jiang Z, Xie HQ, Cheung AW, Lau DT, Fu Q, Dong TT, Chen J, Wang Z, Tsim KW. Anti-oxidative effects of the biennial flower of *Panax notoginseng* against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity in cultured PC12 cells. *Chin Med*, 2010; 28:5-38.
- Ciftci O, Ozdemir I, Tanyildizi S, Yildiz S, Oguzturk H. Antioxidative effects of curcumin,  $\beta$ -myrcene and 1,8-cineole against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced oxidative stress in rats liver. *Toxicol Ind Health*, 2011; 27:447-53.
- Cina C, Maass K, Theis M, Willecke K, Bechberger JF, Naus CC. Involvement of the cytoplasmic C-terminal domain of connexin43 in neuronal migration. *J Neurosci*, 2009; 29:2009-2021.
- Clark JF, Sharp FR. Bilirubin oxidation products (BOXes) and their role in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Cerebr Blood F Met*, 2006; 26:1223-1233.
- Clevenger JF. Apparatus for the determination of volatile oil. *J Amer Phar Assoc*, 1928; 17:345.

- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB Journal*, 2003; 17:1195-1214.
- Crespo ME, Jimenez C, Zarzuelo A. The essential oil of *Salvia lavandulifolia* subspecies *oxydon*. A study of its vegetative cycle. *Planta Med*, 1986; 52:367-369.
- Cross CE, Halliwell, B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D. Oxygen radicals and human disease. *Ann Inter Med*, 1987; 107:526-545.
- Crowell P. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. Symposium on phytochemicals: biochemistry and physiology. *J Nutr*, 1999; Supplement:115S-778S.
- Da Rocha MD, Viegas FP, Campos HC, Nicastro PC, Fossaluzza PC, Fraga CA, Barreiro EJ, Viegas C Jr. The role of natural products in the discovery of new drug candidates for the treatment of neurodegenerative disorders II: Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2011; 10:251-270.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem*, 2006; 52:601-623.
- Dávalos A, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluorescein) assay. *Agric Food Chem*, 2004; 52: 48-54.
- De-Paula VJ, Radanovic M, Diniz BS, Forlenza OV. Alzheimer's disease. *Subcell Biochem*, 2012; 65:329-52.
- Desagher S, Glowinski J, Premont J. Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *J Neurosci*, 1996; 16:2553-2562.
- Deshane J, Wright M, Agarwal A. Heme oxygenase-1 expression in disease states. *Acta Biochimica Polonica* 2005; 52:273-284.
- Deshpande NN, Sorescu D, Seshiah P, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Griendling KK. Mechanism of hydrogen peroxide-induced cell cycle arrest in vascular smooth muscle. *Antioxid Redox Signal*, 2002; 4:845-854.
- Devasagayam TP, Tilak JC, Bloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India*, 2004; 52:794-804.
- Dhib-Jalbut S, Arnold DL, Cleveland DW, Fisher M, Friedlander RM, Mouradian MM. Neurodegeneration and neuroprotection in multiple sclerosis and other neurodegenerative diseases. *J Neuroimmunol*, 2006; 176:198-215.
- Dib M, Garrel C, Favier A, Robin V, Desnuelle C. Can malondialdehyde be used as a biological marker of progression in neurodegenerative disease? *J Neurol*, 2002; 249:367-374.
- Dierckx N, Horvath G, van Gils C, Vertommen J, van de Vliet J, De Leeuw I, et al. Oxidative stress status in patients with diabetes mellitus: relationship to diet. *Eur J Clin Nutr*, 2003; 57:999-1008.
- Donaire F, Fernández-López C, González-Martín A. *Labiadas* de la provincia de Jaén II. *Blancoana*, 1992; 9:79-87.
- Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol*, 2000; 62:649-671.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 2002; 82:47-95.



- Drukarch B, Schepens E, Jongenelen CAM, Stoof JC, Langeveld CH. Astrocyte-mediated enhancement of neuronal survival is abolished by glutathione deficiency. *Brain Res*, 1997; 770:123–130.
- Duarte AR, Naves RR, Santos SC, Seraphin JC, Ferri PH. Genetic and environmental influence on essential oil composition of *Eugenia dysenterica*. *J Braz Chem Soc*, 2010; 21:1459-1467.
- Dumont M, Beal MF. Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med*, 2011; 51:1014–1026.
- Durán VH, Francia JR, Rodríguez CR, Martínez A, Carcéles B. Soil-erosion and runoff prevention by plant covers in a mountainous area (SE Spain): implications for sustainable agriculture. *Environmentalist*, 2006; 26:309-319.
- Duran VH, Rodríguez CR, Francia JR, Cárcelos B, Martínez A, Pérez P. Harvest intensity of aromatic shrubs vs. soil erosion: an equilibrium for sustainable agricultur (SE Spain). *Catena* 2008; 73; 107-116.
- Dweck AC. The folklore and cosmetic use of various *Salvia* species. Sage: the genus *Salvia*. Medicinal and Aromatic Plants. Kintzios, SE (Ed). Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 2000; 14:1-25.
- Edris AE. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother Res*, 2007; 21:308-23.
- Elbirt KK, Bonkovsky HL. Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role. *Proc Assoc Am Physicians*, 1999; 111:438-447.
- Ellman GL, Courtney KD, Valentino C, Zarzuelo A, Feathertone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 1961; 7:88-95.
- Elmann A, Mordechay S, Rindner M, Larkov O, Elkabetz M, Ravid U. Protective effects of the essential oil of *Salvia fruticosa* and its constituents on astrocytic susceptibility to hydrogen peroxide-induced cell death. *J Agric Food Chem*, 2009; 57:6636-41.
- Emerit J, Edeas M, Bricaire F: Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother*, 2004, 58:39-46.
- Ennajar M, Bouajila J, Lebrihi A, Mathieu F, Savagnac A, Abderraba M, Raies A, Romdhane M. The influence of organ, season and drying method on chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities of *Juniperus phoenicea* L. essential oils. *J Sci Food Agric*, 2010; 90:462-470.
- Erlank H, Elmann A, Kohen R, Kanner J. Polyphenols activate Nrf2 in astrocytes via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, semiquinones, and quinones. *Free Radic Biol Med*, 2011; 51:2319-27.
- Escudero J, Perez L, Rabanal MR, Valverde S. Diterpenoids from *Salvia Oxydodon* and *Salvia lavandulifolia*. *Phytochemistry*, 1983; 22:585-587.
- Everse J, Coates PW. Neurodegeneration and peroxidases. *Neurobiol Aging*, 2009; 30:1011-1025.
- Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition*, 2002; 18:872-879.
- Farhat GN, Affara NI, Gali-Muhtasib HU. Seasonal changes in the composition of the essential oil extract of East Mediterranean sage (*Salvia libanotica*) and its toxicity in mice. *Toxicon*, 2001; 39:1601-1605.
- Farombi EO, Surh YJ. Heme-oxygenase-1 as a potential therapeutic target for hepatoprotection. *J Biochem Mol Biol*, 2006, 39:479-491.

- Fattman CL, Schaefer LM, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic Biol Med*, 2003; 35:236-256.
- Fenton HJ. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J Chem Soc*, 1894; 65:899-915.
- Fernández Gonzalez F, Loidi J, Molina A. Contribución al estudio de los matorrales aragoneses: los Salviares riojano-estelleses. *Anales Jard Bot Madrid*, 1986; 42:451-459.
- Figuerola R. Datos nomenclaturales sobre *Salvia lavandulifolia* Vahl y *Salvia blancoana* Webb & Heldr. (*Labiatae*). Notas breves. *Anales Jard Bot Madrid*, 1987; 44:173-174.
- Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 2000; 408:239-247.
- Floyd RA, Hensley K. Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging*, 2002; 23:795-807.
- Font Quer P. Plantas Medicinales, el Dioscórides Renovado. Barcelona: Península, 1999; 678.
- Foray L, Bertrand C, Pinguet F, Soulier M, Astre C, Marion C, Pelissier Y, Bessiere JM. *In vitro* cytotoxic activity of three essential oils from *Salvia* species. *J Essent Oil Res*, 1999; 11:522-526.
- Foresti R, Motterlini R. The heme oxygenase pathway and its interaction with nitric oxide in the control of cellular homeostasis. *Free Radic Res*, 1999; 31:459-475.
- Fournier G, Pages N, Cosperec I. Contribution to the study of *Salvia lavandulaefolia* essential oil: potential toxicity attributable to the sabinyl acetate. *Planta Med*, 1993; 59:96-97.
- Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; 87:4533-4537.
- Franz CM. Essential oil research: past, present and future. *Flavour Frag J*, 2010; 25:112-113.
- Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med*, 1994; 97:5S-13S.
- Fridovich I. Superoxide dismutases. *Adv Enzimol*, 1974; 41:35-97.
- Friederich M, Hansell P, Palm F. Diabetes, oxidative stress, nitric oxide and mitochondria function. *Curr Diabetes Rev*, 2009; 5:120-144.
- Fujita M, Tsuruta R, Kasaoka S, Fujimoto K, Tanaka R, Oda Y, Nanba M, Igarashi M, Yuasa M, Yoshikawa T, Maekawa T. *In vivo* real-time measurement of superoxide anion radical with a novel electrochemical sensor. *Free Radic Biol Med*, 2009; 47, 1039-1048.
- Fukai T, Folz RJ, Landmesser U, Harrison DG. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*, 2002; 55:239-249.
- Gali-Muhtasib H, Hilan C, Khater C. Traditional uses of *Salvia libanotica* (East Mediterranean sage) and the effects of its essential oils. *J Ethnopharmacol*, 2000; 71:513-520.
- Gandhi S, Abramov AY. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev*, 2012; 428010.
- Gemsa D, Woo CH, Fudenberg HH, Schmid R. Stimulation of heme oxygenase in macrophages and liver by endotoxin. *J Clin Invest*, 1974; 53:647-651.
- Ghosh N, Ghosh R, Mandal SC. Antioxidant protection: a promising therapeutic intervention in neurodegenerative disease. *Free Radic Res*, 2011; 45:888-905.

- Giannouli AL, Kintzios SE. Essential oils of *Salvia* spp: examples of intraspecific and seasonal variation. En: Kintzios, SE (Ed). Sage. The Genus *Salvia*. Amsterdam:Harwood Academic Publisher, 2000; 14:69-79.
- Gilca M, Stoian I, Atanasiu V, Virgolici B. The oxidative hypothesis of senescence. *J Postgrad Med*, 2007; 53:207-213.
- Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: The need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacol*, 2001; 40: 959-975.
- Goldberg DM, Spooner RJ. Glutathione reductase. Bergmeyer HU, Bergmeyer J, GraBl M. (ed). Methods of enzymatic analysis, 3rd ed., *Verlag Chemie, Weinheim*, 1983; 111:258-265.
- Golden TR, Patel M. Catalytic antioxidants and neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal*, 2009; 11:555-569.
- Gómez-Serranillos MP, Martín S, Ortega T, Palomino OM, Prodanov M, Vacas V, Hernández T, Estrella I, Carretero ME. Study of red wine neuroprotection on astrocytes. *Plant Foods Hum Nutr* 2009; 64:238-43.
- González-Burgos E, Carretero ME, Gómez-Serranillos MP. Diterpenoids isolated from *Sideritis* species protect astrocytes against oxidative stress via Nrf2. *J Nat Prod*, 2012; 75:1750-1758.
- González-Burgos E, Carretero ME, Gómez-Serranillos MP. Involvement of Nrf2 signaling pathway in the neuroprotective activity of natural kaurane diterpenes. *Neurosci*, 2013; 231:400-412.
- González-Burgos E, Gómez-Serranillos MP. Terpene compounds in the nature: a review of their potential antioxidant activity. *Curr Med Chem*, 2012; 19:5319-5341.
- Gotz ME, Kunig G, Reiderer Y. Oxidative stress: free radical production in neural degeneration. *Pharmacol Ther*, 1994; 63:37-122.
- Grbic G, Culic M, Martac L, Sokovic M, Spasic S, Dokovic D. Effect of camphor essential oil on rat cerebral cortex activity as manifested by fractal dimension changes. *Arch Biol Sci*, 2008; 60:547-553.
- Green DR. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell*, 2000; 102:1-4.
- Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976; 73: 2424-8.
- Grimm S, Hoehn A, Davies KJ, Grune T. Protein oxidative modifications in the ageing brain: consequence for the onset of neurodegenerative disease. *Free Radic Res*, 2011; 45:73-88.
- Gros-Louis F, Gaspar C, Rouleau GA. Genetics of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta*, 2006; 1762:956-972.
- Gu Y, Ting Z, Qiu X, Zhang X, Gan X, Fang Y, Xu X, Xu R. Linalool preferentially induces robust apoptosis of a variety of leukemia cells via upregulating p53 and cyclin-dependent kinase inhibitors. *Toxicology*, 2010; 268:19-24.
- Guillén MD, Cabo N, Burillo J. Characterisation of the essential oils of some cultivated aromatic plants of industrial interest. *J Sci Food Agric*, 1996; 70:359-363.

- Guillén MD, Ibargoitia ML. Wild growing Spanish sage as a raw material in the food industry. Study by gas chromatography/mass spectrometry of its essential oil and extracts in several organic solvents. *Chem Mikrobiol Technol Lebensm*, 1995; 17:129-134.
- Guillén MD, Manzanos MJ. Extractable components of the aerial parts of *Salvia lavandulifolia* and composition of the liquid smoke flavoring obtained from them. *J Agric Food Chem*, 1999; 47:3016-3027.
- Gupta K, Chandran S, Hardingham GE. Human stem cell-derived astrocytes and their application to studying Nrf2-mediated neuroprotective pathways and therapeutics in neurodegeneration. *Br J Clin Pharmacol*, 2012 Nov 5. doi: 10.1111/bcp.12022.
- Gutteridge JM, Halliwell B. Iron toxicity and oxygen radicals. *Baillieres Clin Haematol*, 1989; 2:195-256.
- Haber F, Weiss J. The catalytic compensation of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc London*, 1934; 147:332-351.
- Halassa MM, Haydon PG. Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu Rev Physiol*, 2010; 72:335-355.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals in biology and medicine. 3<sup>o</sup> ed. Oxford, UK: Oxford University Press, 1999.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals in biology and medicine. Oxford; New York, Oxford University Press, 2007.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation in brain homogenates: the role of iron and hydroxyl radicals. *J Neurochem*, 1997; 69:1330-1331.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*, 1990; 186:1-85.
- Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*, 2004; 142:231-255.
- Halliwell B. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev*, 1997; 55:S44-S49.
- Halliwell B. Antioxidants and the central nervous system: some fundamental questions. Is oxidant damage relevant to Parkinson's disease, Alzheimer's disease, traumatic injury or stroke? *Acta Neurol Scandinava*, 2009; 80:23-33.
- Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev*, 1994; 52:253-265.
- Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*, 2006; 97:1634-1658.
- Halliwell B. Oxidative stress in cell culture: an underappreciated problem? *Federation of the Societies of Biochemistry and Molecular Biology Letters*, 2003; 540:3-6.
- Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radic Res*, 1996; 25:57-74.
- Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*, 1992; 59:1609-1623.
- Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med*, 1991; 91:14S-22S.

- Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*, 2001; 18:685-716.
- Hamada N, Tanaka A, Fujita Y, Itoh T, Ono Y, Kitagawa Y, Tomimori N, Kiso Y, Akao Y, Nozawa Y, Ito M. Involvement of heme oxygenase-1 induction via Nrf2/ARE activation in protection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced PC12 cell death by a metabolite of sesamin contained in sesame seeds. *Bioorg Med Chem*, 2011; 19:1959-65.
- Harrison DG, Gongora MC. Oxidative stress and hypertension. *Med Clin North Am*, 2009; 93:621-635.
- Hay RK. Physiology. Hay RK and Waterman PG (eds.), Volatile Oil Crops: Their Biology, *Biochemistry and Production*, Longman, England, 1993: 23-46.
- Heales SJ, Lam AAJ, Duncan AJ, Land JM. Neurodegeneration or neuroprotection: the pivotal role of astrocytes. *Neurochem Res*, 2004; 29:513-9.
- Hedge IC. *Salvia* L. Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Valentine DH, Walters SM, Webb DA (Eds.). *Flora Europaea*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1972; 3:188-192.
- Hendry ER, Worthington T, Conway BR, Lambert PA. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilms cultures. *JAC* 2009; 64:1219-1225.
- Herraiz-Peñalver D, Usano-Alemany J, Cuadrado J, Jordán MJ, Lax V, Sotomayor JA, Palá-Paúl J. Essential oil composition of wild populations of *Salvia lavandulifolia* Vahl. from Castilla-La Mancha (Spain). *Biochem Syst Ecol* 2010; 38:1224-1230.
- Hervás Serrano JL., Peñafiel Trueba MS., Fernández Ocaña AM, Fernández López C. *Labiadas* del Alto Guadalquivir hasta 1995. *Blancoana*, 1997; 14:93-103.
- Hissin PJ, Hilf RA. Fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*, 1976; 74:214-226.
- Hohmann J, Zupkó I, Rédei D, Csányi M, Falkay G, Máthé I, Janicsák G. Protective effects of the aerial parts of *Salvia officinalis*, *Melissa officinalis* and *Lavandula angustifolia* and their constituents against enzyme-dependent and enzyme-independent lipid peroxidation. *Planta Med*, 1999; 65:576-578.
- Höld KM, Sirisoma NS, Casida JE. Detoxification of  $\alpha$ - and  $\beta$ -thujones (the active ingredients of Absinthe): site specificity and species differences in cytochrome P450 oxidation *in vitro* and *in vivo*. *Chem Res Toxicol*, 2001; 14:589-595.
- Hopkins FG, Elliot KA. The relation of glutathione to cell respiration with special reference to hepatic tissue. *Proc Roy Soc London*, 1931; 109:58-88.
- Houghton PJ, Howes MJ. Natural products and derivatives affecting neurotransmission relevant to Alzheimer's and Parkinson's disease. *Neurosignals*, 2005; 14:6-22.
- Houghton PJ, Ren Y, Howes MJ. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Nat Prod Rep*, 2006; 23:181-199.
- Houghton PJ. HerbalGram. Activity and constituents of Sage relevant to the potential treatment of symptoms of Alzheimer's Disease. *American Botanical Council*, 2004; 61:38-53.
- Howell RR, Wyngaarden JB. On the mechanism of peroxidation of uric acids by hemoproteins. *J Biol Chem*, 1960; 235:3544-3550.

- Howes MJ, Perry N, Houghton PJ. Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders. *Phytother Res*, 2003; 17:1-18.
- Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J Agric Food Chem*, 2002; 50:4437-4444.
- Ihrle RA, Alvarez-Buylla A. Cells in astroglial lineage are neuronal stem cells. *Cell Tissue Res*, 2008; 331:179-191.
- Ilmberger J, Heuberger E, Mahrhofer C, Desovic H, Kowarik D, Buchbauer G. The influence of essential oils on human attention. I: Alertness. *Chem Senses*, 2001; 26:239-245.
- Imanshahidi M, Hosseinzadeh. The pharmacological effects of *Salvia* species on the central nervous system. *Phytother Res*, 2006; 20:427-237.
- Janzer RC, Raff MC. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*, 1987; 325:253-256.
- Jaydeokar AV, Bandawane DD, Nipate SS, Chaudhari PD. Natural antioxidants: a review on therapeutic applications. *Res J Pharmacol Phar*, 2012; 4:33-61.
- Jenner P, Olanow CW. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology*, 1996; 47:S161-170.
- Jenner P. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Handb Clin Neurol*, 2007; 83:507-520.
- Jimenez I, Jimenez J, Gámez MJ, González M, Sánchez de Medina F, Zarzuelo A. Effects of *Salvia lavandulifolia* Vahl. Ssp. *oxydon* extract in pancreatic endocrine tissue in streptozotocin-diabetic rats. *Phytother Res*, 1995; 9:536-537.
- Jin P, Wang SY, Gao H, Chen H, Zheng Y, Wang CY. Effect of cultural system and essential oil treatment on antioxidant capacity in raspberries. *Food Chem*, 2012; 132:399-405.
- Jinyoung H, CheonPS, Byung-Soo K, Songhee J. Borneol alleviates oxidative stress via upregulation of Nrf2 and Bcl-2 in SH-SY5Y cells. *Pharm Biol*, 2013; 51:30-35.
- Jirovetz L, Wlcek K, Buchbauer G, Gochev V, Girova T, Stoyanova A, Schmidt E, Geissler M. Antifungal activities of essential oils of *Salvia lavandulifolia*, *Salvia officinalis* and *Salvia sclarea* against various pathogenic *Candida* species. *J Essent Oil Bear Pl*, 2007; 10:430-439.
- Johnston GA, Beart PM. Flavonoids: some of the wisdom of sage? *Br J Pharmacol*, 2004; 142:809-810.
- Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008; 295:C849-868.
- Jordán MJ, Lax V, Rota MC, Lorán S, Sotomayor JA. Effect of the phenological stage on the chemical composition, and antimicrobial and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L essential oil and its polyphenolic extract. *Ind Crops Prod*, 2013; 48:144-152.
- Jordán MJ, Martínez C, Moñino MI, Lax V, Quilez M, Sotomayor JA. Chemical characterization of *Salvia lavandulifolia* subsp. *vellerea* in south-eastern Spain. *Acta Hort*, 2009; 826:317-321.
- Joshi G, Johnson JA. The Nrf2-ARE pathway: a valuable therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases. *Recent Pat CNS Drug Discov*, 2012; 7:218-229.

- Juang HH. Modulation of iron on mitochondrial aconitase expression in human prostatic carcinoma cells. *Mol Cell Biochem*, 2004; 265:185-194.
- Juergens UR, Engelen T, Racké K, Söber M, Gillissen A, Vetter H. Inhibitory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) on cytokine production in cultured human lymphocytes and monocytes. *Pulm Pharmacol Ther*, 2004; 17:281-287.
- Kabuto H, Tada M, Kohno M. Eugenol {2-methoxy-4-(2-propenyl)phenol} prevents 6-hydroxydopamine-induced dopamine depression and lipid peroxidation inductivity in mouse striatum. *Biol Pharm Bull*, 2007; 30:423-427.
- Kaizaki A, Tanaka S, Ishige K, Numazawa S, Yoshida T. The neuroprotective effect of heme-oxygenase (HO) on oxidative stress in HO-1 siRNA-transfected HT22 cells. *Brain Res*, 2006; 1108:39-44.
- Kamatou GP, Van Zyl RL, Van Vuuren SF, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Viljoen AM. Seasonal variation in essential oil composition, oil toxicity and the biological activity of solvent extracts of three South African *Salvia* species. *S Afr J Bot*, 2008; 74:230-237.
- Kanner J, German JB, Kinsella JE. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1987; 25:317-364.
- Kapturczak MH, Wasserfall C, Brusko T, Campbell-Thompson M, Ellis TM, Atkinson MA, Agarwal A. Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse. *Am J Pathol*, 2004; 165:1045-1053.
- Karamanos AJ. The cultivation of sage. Cultivation and breeding. Sage: the genus *Salvia*. Medicinal and Aromatic Plants. Kintzios, SE (Ed). Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 2000; 14:93-108.
- Kargiolaki H, Fournaraki C, Kazakis G, Skoula M. Seasonal differentiation in essential oil composition of *Salvia fruticosa*. Identification, preservation, adaptation and cultivation of selected aromatic and medicinal plants suitable for marginal lands of the mediterranean region. *The cultivation of sage*, 1994, 12-18.
- Keith RF, Elliot F. The preparation and use of isolated cells for metabolic studies. *Tech Metabol Res B*, 1979; 204: 1-20.
- Kelen M, Tepe B. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresour Technol*, 2008; 99:4096-4104.
- Kennedy DO, Dodd FL, Robertson BC, Okello EJ, Reay JL, Scholey AB, Haskell CF. Monoterpenoid extract of sage (*Salvia lavandulaefolia*) with cholinesterase inhibiting properties improves cognitive performance and mood in healthy adults. *J Psychopharmacol*, 2010; 1-13.
- Kennedy DO, Pace S, Haskell C, Okello EJ, Milne A, Scholey AB. Effects of cholinesterase inhibiting Sage (*Salvia officinalis*) on mood, anxiety and performance on a psychological stressor battery. *Neuropsychopharmacol*, 2006; 31:845-852.
- Kennedy DO, Scholey AB. The psychopharmacology of European herbs with cognition-enhancing properties. *Curr Pharm Des*, 2006; 12:4613-4623.
- Kennedy DO, Wightman EL. Herbal extracts and phytochemicals: plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. *American Society for Nutrition, Adv Nutr*, 2011; 2:32-50.
- Kennedy DO. Herbs affecting the central nervous system. Evaluation of herbal medicinal products, 2009; 14:187-202.

- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972; 26, 239-257.
- Keyse SM, Tyrrell RM. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86: 99-103.
- Khandrika L, Kumar B, Koul S, Maroni P, Koul HK. Oxidative stress in prostate cancer. *Cancer letters*, 2009; 282:125-136.
- Khorshidi J, Tabatabaei MF, Omidbaigi R, Sefidkon F. Effect of densities of planting on yield and essential oil components of Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill Var. Soroksary). *J Agric Sci*, 2009; 1:152-157.
- Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M. Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005; 338:558-567.
- Kim HP, Ryter SW, Choi AM. CO as a cellular signaling molecule. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2006; 46:411-449.
- Kim HP, Wang X, Galbiati F, Ryter SW, Choi AM. Caveolae compartmentalization of heme oxygenase-1 in endothelial cells. *FASEB J*, 2004; 18:1080-1089.
- Kirchhoff F, Dringen R, Giaume C. Pathways of neuron-astrocyte interactions and their possible role in neuroprotection. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 2001; 251:159-169.
- Kitamura Y, Ota T, Matsuoka Y, Tooyama I, Kimura H, Shimohana S, Nomura Y, Gebicke-Haerter PJ, Tanguchi T. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis mediated by p53 protein in glial cells. *Glia*, 1999a; 25:154-164.
- Kitamura Y, Taniguchi T, Shimohama S. Apoptotic cell death in neurons and glial cells: Implications for Alzheimer's disease. *Jpn J Pharmacol*, 1999b; 79:1-5.
- Kojo S. Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr Med Chem*, 2004; 11, 1041-1064.
- Koppula S, Kumar H, More SV, Lim HW, Hong SM, Choi DK. Recent updates in redox regulation and free radical scavenging effects by herbal products in experimental models of Parkinson's disease. *Molecules*, 2012; 17:11391-11420.
- Kosodo Y, Huttner WB. Basal process and cell divisions of neural progenitors in the developing brain. *Dev Growth Differ*, 2009; 51:251-261.
- Kregel KC, Zhang HJ. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007; 292:R18-36.
- Krinsky NI. Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radic Biol Med*, 1989; 7:617-635.
- Krishnamurthy P, Wadhwani A. Antioxidant Enzymes and Human Health. In Biochemistry, Genetics and Molecular Biology "Antioxidant Enzyme"; Amr El-Missiry, M., Ed. ISBN: 978-953-51-0789-7, In Tech, DOI: 10.5772/48109; 2012, 3-18.
- Kumar H, Koppula S, Kim IS, More SV, Kim BW, Choi DK. Nuclear factor erythroid 2 - related factor 2 signaling in Parkinson disease: a promising multi therapeutic target against oxidative stress, neuroinflammation and cell death. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2012; 11:1015-1029.



- Lahlou M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytother Res*, 2004; 18:435-448.
- Langa E, Della Porta G, Palavra AMF, Urieta JS, Mainar AM. Supercritical fluid extraction of Spanish sage essential oil: optimization of the process parameters and modelling. *J Supercrit Fluid*, 2009; 49:174-181.
- Lawrence BM, Hogg JW, Terhune SJ. Essential oils and their constituents. III. Some new trace constituents in the essential oil of *Salvia lavandulifolia*, Vahl. *J Chromatog*, 1970; 50:59-65.
- Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in seleniumdeficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*, 1976; 71: 952-958.
- Le Bras M, Clement MV, Pervaiz S, Brenner C. Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histol Histopathol*, 2005; 20:205-219.
- LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol*, 1992; 5:227-231.
- Lee J, Koo N, Min DB. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Compreh Rev Food Sci Food Safety*, 2004; 3:21-33.
- Lee PJ, Jiang BH, Chin BY, Iyer NV, Alam J, Semenza GL, Choi AM. Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J Biol Chem*, 1997; 272:5375-5381.
- Lee SW, Clemenson GD, Gage FH. New neurons in an aged brain. *Behav Brain Res*, 2012; 227:497-507.
- Li A, Han L, Han CC. Antioxidant and neuroprotective activities of essential oil, isolated from Chinese herb pairs of *Angelica sinensis* and *Sophora flavescens*. *J Appl Pharm Sci*, 2012; 2:01-04.
- Li CQ, Kim MY, Godoy LC, Thiantanawat A, Trudel LJ, Wogan GN. Nitric oxide activation of Keap1/Nrf2 signaling in human colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009; 106:14547-14551.
- Liddell JR, Robinson SR, Dringen R, Bishop GM. Astrocytes retain their antioxidant capacity into advanced old age. *Glia*, 2010; 58:1500-1509.
- Lima CF, Carvalho F, Fernandes E, Bastos ML, Santos-Gomes PC, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C. Evaluation of toxic/protective effects of the essential oil of *Salvia officinalis* on freshly isolated rat hepatocytes. *Toxicol in vitro*, 2004; 18:457-465.
- Liu H, Wang H, Shenvi S, Hagen TM, Liu RM. Glutathione metabolism during aging and in Alzheimer disease. *Ann NY Acad Sci*, 2004; 1019:346-349.
- Loizzo MR, Menichini F, Tundis R, Bonesi M, Conforti F, Nadjafi F, Statti GA, Frega NG, Menichini F. *In vitro* biological activity of *Salvia leriifolia* Benth essential oil relevant to the treatment of Alzheimer's disease. *J Oleo Sci*, 2009; 58:443-446.
- López A, El-Naggar T, Dueñas M, Ortega T, Estrella I, Hernández T, Gómez-Serranillos MP, Palomino OM, Carretero ME. Effect of cooking and germination on phenolic composition and biological properties of dark beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chem*, 2013; 138: 547-555.

- López G. Los árboles y arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares: especies silvestres y las principales cultivadas. 2ª ed, 2006; 2:1401-1403.
- López-Muñoz F, Boya J, Alamo C. Neuron theory, the cornerstone of neuroscience, on the centenary of the Nobel Prize award to Santiago Ramón y Cajal. *Brain Research Bulletin*, 2006; 70:391-405
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951; 193:267-275.
- Lu Y, Foo Y. Polyphenolics of *Salvia*-a review. *Phytochemistry* 2002; 59:117-140.
- M'Hir S, Sifi S, Chammem N, Sifaoui I, Mejri A, Hamdi M, Abderrabba M. Antioxidant effect of essential oils of Thymus, Salvia and Rosemarinus on the stability to auxidation of refined oils. *Ann Biol Res*, 2012; 3:4259-4263.
- Ma Q, He X. Molecular basis of electrophilic and oxidative defense: promises and perils of Nrf2. *Pharmacol Rev*, 2012; 64:1055-1081.
- Maines MD, Ewing JF, Huang TJ, Panahian N. Nuclear localization of biliverdin reductase in the rat kidney: response to nephrotoxins that induce heme oxygenase-1. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001; 296:1091-1097.
- Maines MD, Kappas A. Cobalt induction of hepatic heme oxygenase; with evidence that cytochrome P-450 is not essential for this enzyme activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974; 71:4293-4297.
- Maines MD, Trakshel GM, Kutty RK Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem*, 1986; 261:411-419.
- Maines MD. The heme oxygenase system: update 2005. *Antioxid Redox Signal*, 2005; 7:1761-1766.
- Makar TK, Nedergaard M, Preuss A, Gelbard AS, Perumal AS, Cooper AJ. Vitamin E, ascorbate, glutathione, Glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain. *J Neurochem*, 1994; 62:45-53.
- Makker K, Agarwal A, Sharma R. Oxidative stress and male infertility. *Indian J Med Res*, 2009; 129:357-367.
- Mantle D, Pickering AT, Perry EK. Medicinal plant extracts for the treatment of Dementia. A review of their pharmacology, efficacy and tolerability. *CNS Drugs*, 2000; 13:201-213.
- Mao P. Oxidative stress and its clinical applications in dementia. *J Neurodegener Dis*, 2013. Article ID 319898, 15 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/319898>.
- Maragakis NJ, Rothstein JD. Mechanisms of disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol*, 2006; 2:679-689.
- Marcos ME, Garcia MC, F Muñoz F, Polo LM. The essential oil of *Salvia lavandulaefolia* Vahl. *Dev Food Sci*, 1988; 18:147-160.
- Markiewicz I, Lukomska B. The role of astrocytes in the physiology and pathology of central nervous system. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2006; 66:343-358.

- Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*, 1974; 47:469-474.
- Martín S, González-Burgos E, Carretero ME, Gómez-Serranillos MP. Neuroprotective properties of Spanish red wine and its isolated polyphenols on astrocytes. *Food Chem*, 2011; 128:40-48.
- Martín S, González-Burgos E, Carretero ME, Gómez-Serranillos MP. Protective effects of Merlot red wine extract and its major polyphenols in PC12 Cells under oxidative stress conditions. *J Food Sci*, 2013; 78: H112-H118.
- Martín S. Estudio de la actividad neuroprotectora de diferentes vinos monovarietales de la Comunidad de Madrid. Tesis Doctoral. *Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid*, 2009.
- Masada Y. Analysis of essential oils by gas chromatography and mass spectrometry. *John Wiley*, New York, 1976.
- Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*, 2005; 16:577-586.
- Mathé I, Mathé A, Hohmann J, Janicsak G. Volatile and some nonvolatile chemical constituents of Mediterranean *Salvia* species beyond their native area. *Israel J Plant Sci*, 2010; 58:273-277.
- Mayne ST. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J Nutr*, 2003; 133:933S-940S.
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*, 1969; 244:6049-6055.
- McCord JM. Superoxide dismutase in aging and disease: an overview. *Methods Enzymol*, 2002; 349:331-341.
- McCoubrey WK, Huang TJ, Maines MD. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem*, 1997; 247:725-732.
- Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature* 2000; 407:796-801.
- Melo A, Monteiro L, Lima RM, Oliveira DM, Cerqueira MD, El-Bach'a RS. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: mechanisms and therapeutic perspectives. *Oxid Med Cell Longev*, 2011; 1-14.
- Mhyre TR, Boyd JT, Hamill RW, Maguire-Zeiss KA. Parkinson's disease. *Subcell Biochem*, 2012; 65:389-455.
- Michavila A, Fernandez-Gadea F, Rodriguez B. Abietane diterpenoids from the root of *Salvia lavandulaefolia*. *Phytochemistry*, 1986; 25:266-268.
- Miguel MG. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 2010; 15:9252-9287.
- Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*, 1978; 86:271-278.

- Miles AM, Bohle DS, Glassbrenner PA, Hansert B, Wink DA, Grisham MB. Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide. *J Biol Chem*, 1996; 271:40-47.
- Miller DM, Buettner GR, Aust SD. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Rad Biol Med*, 1990; 8:95-108.
- Millet Y, Jouglard J, Steinmetz MD, Tognetti P, Joanny P, Arditti J. Toxicity of some essential plant oils. Clinical and experimental study. *Clin Toxicol*, 1981; 18:1485-1498.
- Mills GC. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem*, 1957; 229:189-97.
- Min KJ, Yang MS, Kim SU, Jou I, Joe EH. Astrocytes induce hemeoxygenase- 1 expression in microglia: a feasible mechanism for preventing excessive brain inflammation. *J Neurosci*, 2006; 26:1880-1887.
- Minamino T, Christou H, Hsieh CM, Liu Y, Dhawan V, Abraham NG, Perrella MA, Mitsialis SA, Kourembanas S. Targeted expression of heme oxygenase-1 prevents the pulmonary inflammatory and vascular responses to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; 98:8798-8803.
- Mitic-Culafic D, Zegura B, Nikolic B, Vukovic-Gacic B, Knezevic-Vukcevic J, Filipic M. Protective effect of linalool, myrcene and eucalyptol against t-butyl hydroperoxide induced genotoxicity in bacteria and cultured human cells. *Food Chem Toxicol*, 2009; 47:260-266.
- Miyazawa M, Yamafuji C. Inhibition of acetylcholinesterase activity by bicyclic monoterpenoids *J Agric Food Chem*, 2005; 53:1765-1768.
- Mo L, Yang C, Gu M, Zheng D, Lin L, Wang X, Lan A, Hu F, Feng J. PI3K/Akt signaling pathway-induced heme oxygenase-1 upregulation mediates the adaptive cytoprotection of hydrogen peroxide preconditioning against oxidative injury in PC12 cells. *Int J Mol Med*, 2012; 30:314-20.
- Molina JA, Jiménez-Jiménez FJ, Fernandez-Calle P, Lalinde L, Tenias JM, Pondal M, Vazquez A, Codoceo R. Serum lipid peroxides in patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 1992; 136:137-140.
- Monboisse JC, Gardes-Albert M, Randoux A, Borel JP, Ferradini C. Collagen degradation by superoxide anion in pulse and gamma radiolysis. *Bioch Biophys Acta*, 1988; 965:29-35.
- Moncada S, Palmer RM. Biosynthesis and actions of nitric oxide. *Seminars in Perinatology*, 1991; 15, 16-19.
- Morris CR, Suh JH, Hagar W, Larkin S, Bland DA, Steinberg MH, Vichinsky EP, Shigenaga M, Ames B, Kuypers FA, Klings ES. Erythrocyte glutamine depletion, altered redox environment, and pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood*, 2008; 111:402-410.
- Morrison B, Hensley K, Pioro EP, Petri S, Kiaei M. Amyotrophic lateral sclerosis and novel therapeutic strategies. *Neurol Res Int*, 2012, ID 798028, 3, doi:10.1155/2012/798028.
- Morse D, Choi AM. Heme oxygenase-1: from bench to bedside. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005; 172: 660-670.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth*, 1983; 65:55-63.

- Moss L, Rouse M, Wesnes KA, Moss M. Differential effects of the aromas of *Salvia* species on memory and mood. *Hum. Psychopharmacol Clin Exp*, 2010; 25:388-396.
- Motterlini R, Foresti R, Intaglietta M, Winslow RM. NO-mediated activation of heme oxygenase: endogenous cytoprotection against oxidative stress to endothelium. *Am J Physiol*, 1996; 270:H107-H114.
- Najafi F, Moghadam PR. Effect of irrigation regimes and plant density on yield and agronomic characteristics of blond psyllium (*plantago ovata*). *J Agric Sci Tech*, 2002; 16:59-65.
- Nath S, Agholme L, Kurudenkandy FR, Granseth B, Marcusson J, Hallbeck M. Spreading of neurodegenerative Pathology via Neuron-to-Neuron Transmission of  $\beta$ -Amyloid. *J Neurosci*, 2012; 32:8767-8777.
- Naval MV, Gómez-Serranillos MP, Carretero ME, Villar AM. Neuroprotective effect of a ginseng (*Panax ginseng*) root extract on astrocytes primary culture. *J Ethnopharmacol*, 2007; 112: 262-270.
- Naval MV, Gómez-Serranillos MP, Carretero ME. Value of high-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in the determination of *Panax ginseng* radix extract effect in cultured neurons. *J Chromatogr A*, 2006; 1121:242-247.
- Naval MV. Estudio de la actividad sobre el sistema nervioso central de *Panax ginseng* C.A. Meyer. Tesis Doctoral. *Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid*, 2006.
- Navarrete M, Perea G, Fernandez de Sevilla D, Gómez-Gonzalo M, Nuñez A, et al. Astrocytes mediate *in vivo* cholinergic-induced synaptic plasticity. *PloS Biol*, 2012; 10:e1001259. doi:10.1371/journal.pbio.1001259.
- Neymotin A, Calingasan NY, Wille E, Naseri N, Petri S, Damiano M, Liby KT, Risingsong R, Sporn M, Beal MF, Kiaei M: Neuroprotective effect of Nrf2/ARE activators, CDDO ethylamide and CDDO trifluoroethylamide, in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med*, 2011; 51:88-96.
- Nguyen V, Bonds DV, Prokai L. Measurement of hydroxyl-radical formation in the rat striatum by *in vivo* microdialysis and GC-MS. *Chromatographia*, 2008; 68:57-62.
- Nie G, Chen G, Sheftel AD, Pantopoulos K, Ponka P. *In vivo* tumor growth is inhibited by cytosolic iron deprivation caused by the expression of mitochondrial ferritin. *Blood*, 2006; 108:2428-2434.
- Nieto FJ, Iribarren C, Gross MD, Comstock GW, Cutler RG. Uric acid and serum antioxidant capacity: a reaction to atherosclerosis? *Atherosclerosis*, 2000; 148:131-139.
- Niizuma K, Endo H, Chan PH. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival. *Journal of Neurochemistry*, 2009; 109:133-138.
- Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005; 338:668-676.
- Niki E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biol Med*, 2010; 49:503-515.
- Niki E. Do antioxidants impair signaling by reactive oxygen species and lipid oxidation products? *FEBS Lett*, 2012; 586:3767-3770.
- Okouchi M, Ekshyyan O, Maracine M, Aw TY. Neuronal apoptosis in neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal*, 2007; 9:1059-96.

- Olivero RJ. Digestibilidad de los compuestos termooxidados y su influencia sobre la defensa antioxidante intestinal en rata, efectos del ayuno u grado de alteración del aceite de fritura. Tesis Doctoral. *Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá*, 2011.
- Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior R. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem*, 2001; 49:4619-4626.
- Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay: a comparative study. *J Agric Food Chem*, 2002; 50: 3122-3128.
- Ozben T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *J Pharm Sci*, 2007; 96:2181-2196.
- Ozkan G, Baydar H, Erbas S. The influence of harvest time on essential oil composition, phenolic constituents and antioxidant properties of Turkish oregano (*Origanum onites* L.) *J Sci Food Agric*, 2010; 90:205-209.
- Ozturk M, Gulsen T, Duru ME, Mansur H, Topcu G. The effect of temperature on the essential oil components of *Salvia potentillifolia* obtained by various methods. *Nat Prod Commun*, 2009; 4:1017-1020.
- Pages N, Fournier G, Velut V, Imbert C. Potential teratogenicity in mice of the essential oil of *Salvia lavandulaefolia* Vahl. Study of a fraction rich in sabinyl acetate. *Phytotherapy Res*, 1992; 6:80-83.
- Paglia D, Valentine W. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, 1967; 70 158-169.
- Palacio S, Milla R, Albuixech J, Pérez-Rontomé C, Camarero JJ, Maestro M, Montserrat-Martí G. Seasonal variability of dry matter content and its relationship with shoot growth and nonstructural carbohydrates. *New Phytologist*, 2008; 180:133-142.
- Palacio S, Millard P, Montserrat-Martí G. Aboveground biomass allocation patterns within Mediterranean sub-shrubs: a quantitative analysis of seasonal dimorphism. *Flora*, 2006; 201:612-622.
- Pamplona R, Constantini D. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *Am J Physiol*, 2011; 301:R843-R863.
- Panagiotopoulos E, Kapetanos C, Skapeti M, Cholevas C, Drossopoulos J, Loukas M and Kintzios SE. The ecophysiology of *Salvia*: disorders and adaptation. Sage: the genus *Salvia*. Medicinal and Aromatic Plants. Kintzios, SE (Ed). Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 2000a; 14:125-133.
- Panagiotopoulos E, Skapeti M, Kapetanos C. Production of secondary metabolites using liquid culture of *Salvia* plants: up-to-date reports and scale-up potential. Sage: the genus *Salvia*. Medicinal and Aromatic Plants. Kintzios, SE (Ed). Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 2000b; 14:251-262.
- Papageorgiou V, Gardeli C, Mallouchos A, Papaioannou M, Komaitis M. Variation of the chemical prolife and antioxidant behavior of *Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia fruticosa* Miller grown in Greece. *J Agric Food Chem*, 2008; 56:7254-7264.

- Park TJ, Seo HK, Kang BJ, Kim KT. Non competitive inhibition by camphor of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol*, 2001; 61:787-793.
- Pavelka M, Roth J. Central nervous system: neuron, glial cells. *Functional Ultrastructure*, 2010; 316-317.
- Peana AT, Marzocco S, Popolo A, Pinto A. (-)-linalool inhibits in vitro NO formation: probable involment in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. *Life Sci*, 2006; 78:719-723.
- Pereira MD, Ksiazek K, Menezes R. Oxidative stress in neurodegenerative diseases and ageing. *Oxid Med Cell Longev*, 2012:796360. doi: 10.1155/2012/796360.
- Pérez MP. *Salvia lavandulaefolia* Vahl ssp. *oxyodon*: evaluación de su aceite esencial e incidencia en el medio ambiente según intensidades de recolección. Tesis Doctoral. *Facultad de Farmacia. Universidad de Granada*, 2005.
- Perry EK, Pickering AT, Wang WW, Houghton PJ, Perry NS. Medicinal plants and Alzheimer's disease: integrating ethnobotanical and contemporary scientific evidence. *J Altern Complement Med*, 1998; 4:419-428.
- Perry EK, Pickering AT, Wang WW, Houghton PJ, Perry NS. Medicinal plants and Alzheimer's disease: from ethnobotany to phytotherapy. *J Pharm Pharmacol*, 1999; 51:527-534.
- Perry NB, Anderson RE, Brennan NJ, Douglas MH, Heaney AJ, McGimpsey JA, Smallfield BM. Essential oils from *Dalmatian Sage* (*Salvia officinalis* L.): variations among individuals, plants parts, seasons, and sites. *J Agric Food Chem*, 1999; 47:2048-2054.
- Perry NS, Bollen C, Perry EK, Ballard C. *Salvia* for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Pharmacol Biochem Behav*, 2003; 75:651-659.
- Perry NS, Court G, Bidet N, Court J, Perry EK. European herbs with cholinergic activities: potential in dementia therapy. *Int J Geriatric Psychiatry*, 1996; 11:1063-1069.
- Perry NS, Houghton PJ, Jenner P, Keith A, Perry EK. *Salvia lavandulaefolia* essential oil inhibits cholinesterase *in vivo*. *Phytomedicine*, 2002; 9:48-51.
- Perry NS, Houghton PJ, Sampson J, Theobald A, Hart S, Lis-Balchin M, Hoult R, Evans P, Jenner P, Milligan S, Perry EK. *In-vitro* activity of *S.lavandulaefolia* (Spanish sage) relevant to treatment of Alzheimer's disease. *J Pharm Pharmacol*, 2001; 53:1347-1356.
- Perry NS, Houghton PJ, Theobald A, Jenner P, Perry EK. *In-vitro* inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes. *J Pharm Pharmacol*, 2000a; 52:895-902.
- Perry NS, Howes MJ, Houghton PJ, Perry EK. Why sage may be a wise remedy: effects of *Salvia* on the nervous system. Sage: the genus *Salvia*. Medicinal and Aromatic Plants. Kintzios, SE (Ed). Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 2000b; 14:207-223.
- Perry NS, Perry EK. Aromatherapy in the management of psychiatric disorders. *CNS Drugs*, 2006; 20:257-280.
- Peuchen S, Bolaños JP, Heales SJR, Almeida A, Duchen MR, Clark JB. Interrelationships between astrocyte function, oxidative stress and antioxidant status within the central nervous system. *Prog Neurobiol*, 1997; 52:261-281.

- Pierozan MK, Pauletti GF, Rota L, Santos ACA, Lerin LA, Di Luccio M, Mossi AJ, Atti-Serafini L, Cansian RL, Oliveira JV. Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *Salvia* L. species. *Cienc Tecnol Aliment*, 2009; 29:764-770.
- Porres-Martínez M, Gómez-Serranillos MP, Carretero ME. *Salvia lavandulifolia* Vahl: características botánicas, composición química y actividad biológica. *Revista de Fitoterapia*, 2012; 12:53-63.
- Porter NA, Caldwell SE, Mills KA. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids*, 1995; 277-290.
- Postlethwait EM, Langford SD, Jacobson LM, Bidani A. NO<sub>2</sub> reactive absorption substrates in rat pulmonary surface lining fluids. *Free Radic Biol Med*, 1995; 19:553-563.
- Powers SK, Lennon SL. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc*, 1999; 58:1025-1033.
- Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem*, 2005; 53:4290-4302.
- Pryor WA. Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Rad Biol Med*, 2000; 28:141-164.
- Putievsky E, Ravid U, Dudai N. The influence of season and harvest frequency on essential oil and herbal yields from a pure clone of sage (*Salvia officinalis*) grown under cultivated conditions. *J Nat Prod*, 1986; 49:326-329.
- Quintans-Júnior L, Moreira JC, Pasquali MA, Rabie SM, Pires AS, Schröder R, Rabelo TK, Santos JP, Lima PS, Cavalcanti SC, Araújo AA, Quintans JS, Gelain DP. Antinociceptive activity and redox profile of the monoterpenes (+)-camphene, *p*-cymene, and geranyl acetate in experimental models. *ISRN Toxicology*, 2013; 1-11.
- Raja RR. Medicinally potential plants of Labiatae (Lamiaceae) family: an overview. *J Med Plant Res*, 2012; 6:203-213.
- Ramalingam M, Kim S. Reactive oxygen/nitrogen species and their functional correlations in neurodegenerative diseases. *J Neural Transm*, 2012; 119:891-910.
- Ramírez-Expósito MJ, Martínez-Martos JM. Estructura y funciones de la macroglía en el sistema nervioso central. Respuesta a procesos degenerativos. *Revista de Neurología*, 1998; 26:600-611.
- Ramos AA, Azqueta A, Pereira-Wilson C, Collins AR. Polyphenolic compounds from *Salvia* species protect cellular DNA from oxidation and stimulate DNA repair in cultured human cells. *J Agric Food Chem*, 2010; 58:7465-7471.
- Rao KS. Free radical induced oxidative damage to DNA: relation to brain aging and neurological disorders. *Indian J Biochem Biophys*, 2009; 46:9-15.
- Re L, Barocci S, Sonnino S, Mencarelli A, Vivani C, Paolucci G, Scarpantonio A, Rinaldi L, Mosca E. Linalool modifies the nicotinic receptor-ion channel kinetics at the mouse neuromuscular junction. *Pharm Res*, 2000; 42:177-181.
- Real Farmacopea Española, Ministerio de Sanidad y Consumo. 2ª Ed. 2002: 197.
- Reales A, Rivera D, Palazón JA, Obón C. Numerical taxonomy study of *Salvia* sect. *Salvia* (Labiatae). *Bot J Linnean Soc*, 2004; 145:353-371.



- Reddy VP, Zhu X, Perry G, Smith MA. Oxidative stress in diabetes and Alzheimer's disease. *J Alzheimer Dis*, 2009; 16:763-774.
- Reed JC. Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Discov*, 2002; 1:111-121.
- Röhl C, Armbrust E, Kolbe K, Lucius R, Maser E, Venz S, Gülden M. Activated microglia modulate astroglial enzymes involved in oxidative and inflammatory stress and increase the resistance of astrocytes to oxidative stress *in vitro*. *Glia*, 2008; 56:1114-26.
- Röhrdanz E, Schmuck G, Ohler S, Tran-Thi QH, Kahl R. Changes in antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide in rat astroglial cells. *Arch Toxicol*, 2001; 75:150-158.
- Rosua JL, Blanca G. Acerca de la distribución de la sección *Salvia* (genero *Salvia* L., *Lamiaceae*) en la región mediterránea occidental y sus relaciones de vicarianza con el este del mediterráneo. *Lagascalia*, 1990; 15:137-143.
- Rosua JL, Blanca G. Notas cariosistemáticas de la sección *Salvia* del género *Salvia* L. (*Lamiaceae*). *Anales Jard Bot*, 1985; 42:101-112.
- Rosua JL, Blanca G. Revisión del género *Salvia* L. (*Lamiaceae*) en el mediterráneo occidental: la sección *Salvia*. *Acta Bot Malacitana*, 1986; 11: 227-272.
- Rota C, Carramiñana J, Burillo J, Herrera A. *In vitro* antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *J Food Prot*, 2004; 67:1252-1256.
- Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, Willecke K, Giaume C. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science*, 2008; 322:1551-1555.
- Ruiz C, Casarejos MJ, Gómez A, Solano R, de Yebenes JG, Mena MA. Protection by glia-conditioned medium in a cell model of Huntington disease. *PLoS Curr*, 2012 Jul 2;4:e4fbca54a2028b. doi: 10.1371/4fbca54a2028b.
- Ryter SW, Morse D, Choi AM. Carbon monoxide: to boldly go where NO has gone before. *Sci STKE*, 2004; 6-10.
- Ryter SW, Otterbein LE, Morse D, Choi AM. Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Mol Cell Biochem*, 2002; 234-235:249-263.
- Sáez L. *Salvia* L. Vol. XII.: Verbenaceae-Labiatae-Callitrichaceae. Morales R, Quintanar A, Cabezas F, Pujadas AJ, Cirujano S (Eds.). *Flora ibérica*, Real Jardín Botánico de Madrid (CSIC), Madrid. 2010: 298-326.
- Sajewicz M, Rzepa J, Hajnos M, Wojtal L, Staszek D, Kowalska T, Waksmundzka-Hajnos M. GC-MS study of the performance of different techniques for isolating the volatile fraction from sage (*Salvia* L.) species, and comparison of seasonal differences in the composition of this fraction. *Acta Chromatogr*, 2009; 21:453-471.
- Sajewicz M, Wojtal L, Staszek D, Hajnos M, Waksmundzka-Hajnos M, Kowalska T. Low temperature planar chromatography-densitometry and gas chromatography of essential oils from different sage (*Salvia*) species. *J Liq Chromatogr R T*, 2010; 33:936-947.
- Santos FA, Silva RM, Campos AR, de Araujo RP, Lima Junior RCP, Rao VSN. 1,8-cineole (eucalyptol), a monoterpene oxide attenuates the colonic damage in rats on acute TNBS-colitis. *Food Chem Toxicol*, 2004; 42:579-584.

- Santos-Gomes PC, Fernandes-Ferreira M. Organ- and season-dependent variation in the essential oil composition of *Salvia officinalis* L. cultivated at two different sites. *J Agric Food Chem*, 2001; 49:2908-2916.
- Savelev S, Okello E, Perry EK. Butyryl- and acetyl-cholinesterase inhibitory activities in the essential oils of *Salvia* species and their constituents. *Phytother Res*, 2004; 18:315-324.
- Savelev S, Okello E, Perry NSL, Wilkins RM, Perry EK. Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoid in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. *Pharmacol Biochem Behav*, 2003; 75:661-668.
- Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol*, 2008; 21:172-188.
- Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Rad Biol Med*, 2001; 30, 1191-1212.
- Schmiderer C, Grassi P, Novak J, Franz C. Diversity of essential oil glands of Spanish Sage (*Salvia lavandulifolia* Vahl, *Lamiaceae*). *Nat Prod Commun*, 2008; 3:1155-1160.
- Schnitzler P, Wiesenhofer K, Reichling J. Comparative study on the cytotoxicity of different *Myrtaceae* essential oils on cultures Vero and RC-37 cells. *Pharmazie*, 2008; 63:830-835.
- Scholey AB, Tildesley NT, Ballard CG, Wesnes KA, Tasker A, Perry EK, Kennedy DO. An extract of *Salvia* (sage) with anticholinesterase properties improves memory and attention in healthy older volunteers. *Psychopharmacology*, 2008; 198:127-139.
- Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem*, 2000; 267:4904-4911.
- Sheikh IA, Ali R, Dar TA, Kamal MA. An overview on potential neuroprotective compounds for management of Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2012; 11:1012-1014.
- Shibahara S, Nakayama M, Kitamuro T, Uono-Fujimori R, Takahashi K. Repression of heme oxygenase-1 expression as a defense strategy in humans. *Exp Biol Med*, 2003; 228:472-473.
- Shim JS, Kim HG, Ju MS, Choi JG, Jeong SY, Oh MS. Effects of the hook of *Uncaria rhynchophylla* on neurotoxicity in the 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *J Ethnopharmacol*, 2009; 126:361-365
- Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, et al. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol*, 1994; 36:348-355.
- Sidoryk-Wegrzynowicz M, Wegrzynowicz M, Lee E, Bowman AB, Aschner M. Role of astrocytes in brain function and disease. *Toxicol Pathol*, 2011; 39:115-123.
- Sies H, Cadenas E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1985; 311:617-631.
- Sies H, Stahl W, Sevanian A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J Nutr*, 2005; 135:969-972.
- Sies H, Stahl W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr*, 1995; 62:1315S-1321S.
- Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chem*, 1986; 25:1058-1071.

- Singh S, Swarnkar S, Goswami P, Nath C. Astrocytes and microglia: responses to neuropathological conditions. *Int J Neurosci*, 2011; 121:589-597.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 1985; 150:76-85.
- Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, 2010; 119:7-35.
- Srinivasan K. Dietary spices as beneficial modulators of lipid profile in conditions of metabolic disorders and diseases. *Food & Function*, 2013; DOI: 10.1039/c2fo30249g.
- Stark GR, Brown RE, Kerr IM. Assay of (2'-5')-oligoadenylic acid synthetase levels in cells and tissues: a convenient poly(I) poly(C) paper-bound enzyme assay. *Meth Enzymol*, 1981; 79:194-199.
- Steele ML, Robinson SR. Reactive astrocytes give neurons less support: implications for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 2012; 33:423.e1-13.
- Steele ML, Truong J, Govindaraghavan S, Ooi L, Sucher NK, Münch G. Cytoprotective properties of traditional Chinese medicinal herbal extracts in hydrogen peroxide challenged human U373 astroglia cells. *Neurochem Int*, 2013; 62:522-529.
- Stevens B. Neuron-astrocyte signaling in the development and plasticity of neural circuits. *Neurosignals*, 2008; 16:278-288.
- Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*, 1987; 235:1043-1046.
- Su B, Wang X, Nunomura A, Moreira PI, Lee HG, Perry G, Smith MA and Zhu X. Oxidative stress signaling in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, 2008; 5:525-532.
- Takahashi S, Abe T, Gotoh J, Fukuuchi Y. Substrate-dependence of reduction of MTT: a tetrazolium dye differs in cultured astroglia and neurons. *Neurochem Int*, 2002; 40:441-448.
- Takebe G, Yarimizu J, Saito Y, Hayashi T, Nakamura H, Yodoi J, Nagasawa S, Takahashi K. A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. *J Biol Chem*, 2002; 277:41254-41258.
- Takuma K, Baba A, Matsuda T: Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Prog neurobiol*, 2004; 72:111-127.
- Talanian RV, Quinlan C, Trautz S, Hackett MC, Mankovich JA, Banach D, Ghayur TDK, Wong B, Wong WW. Substrate Specificities of Caspase Family Proteases. *Biol Chem*, 1997; 272:9677-9682.
- Tambe Y, Tsujiuchi H, Honda G, Ikeshiro Y, Tanaka S. Gastric cytoprotection of the non-steroidal anti-inflammatory sesquiterpene,  $\beta$ -caryophyllene. *Planta Med*, 1996; 62:469-470.
- Tandogan B, Ulusu NN. Kinetic mechanism and molecular properties of glutathione. *J Pharm Sci*, 2006; 31:230-237.
- Tasker JG, Oliet SH, Bains JS, Brown CH, Stern JE. Glial regulation of neuronal function: from synapse to systems physiology. *J Neuroendocrinol*, 2012; 24:566-576.
- Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1968; 61:748-755.

- Thackeray FL, Haskell CF, Kennedy DO. Sensitivity of a range of cognitive and mood measures to the psychoactive effects of an essential oil of *Salvia lavandulaefolia*. *Appetite* 2010; 55:173.
- Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition*, 2000; 16:716-718.
- Tildesley NT, Kennedy DO, Perry EK, Ballard C, Savelev S, Wesnes KA, Scholey AB. *Salvia lavandulaefolia* (Spanish Sage) enhances memory in healthy young volunteers. *Pharmacol Biochem Behav*, 2003; 75:669-674.
- Tildesley NT, Kennedy DO, Perry EK, Ballard C, Wesnes KA, Scholey AB. Positive modulation of mood and cognitive performance following administration of acute doses of *Salvia lavandulaefolia* essential oil to healthy young volunteers. *Physiol Behav*, 2005; 83:699-709.
- Tomer DP, McLeman LD, Ohmine S, Scherer PM, Murray BK, O'Neill KL. Comparison of the total oxyradical scavenging capacity and oxygen radical absorbance capacity antioxidant assays. *J Med Food*, 2007; 10:337-344.
- Topcu G. Bioactive triterpenoids from *Salvia* species. *J Nat Prod*, 2006; 69:482-487.
- Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal*, 2008; 10:1343-1374.
- Trakshel GM, Maines MD. Multiplicity of heme oxygenase isozymes. HO-1 and HO-2 are different molecular species in rat and rabbit. *J Biol Chem*, 1989; 264:1323-1328.
- Tundis R, Statti GA, Conforti F, Bianchi A, Agrimonti C, Sacchetti G, Muzzoli M, Ballero M, Menichini F, Poli F. Influence of environmental factors on composition of volatile constituents and biological activity of *Helichrysum italicum* (Roth) Don (Asteraceae). *Nat Prod Res*, 2005; 19: 379-387.
- Ulubelen A. Terpenoids in the genus *Salvia*. Chemical constituents. Sage: the genus *Salvia*. Medicinal and Aromatic Plants. Kintzios, SE (Ed). Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 2000; 14:55-68.
- Usano J. Estudio del efecto de los factores ambientales y agronómicos sobre la producción de los aceites esenciales de *Salvia lavandulifolia* Vahl. Tesis Doctoral. *Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid*, 2012.
- Vajda FJ. Neuroprotection and neurodegenerative disease. *J Clin Neurosci*, 2002; 9:4-8.
- Valdes-Bermejo E, López G. Aportaciones a la flora española. *Anal Inst Bot Cavanilles*, 1977; 34:157-173.
- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes C, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*, 2004; 266:37-56.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007; 39:44-84.
- Valko M, Rhodes CJ., Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact*, 2006; 160:1-40.
- Van Muiswinkel FL, Kuiperij HB. The Nrf2-ARE Signalling pathway: promising drug target to combat oxidative stress in neurodegenerative disorders. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 2005; 4:267-81.

- Vega-Agapito V, Almeida A, Hatzoglou M, Bolanos JP. Peroxynitrite stimulates L-arginine transport system y(+) in glial cells. A potential mechanism for replenishing neuronal L-arginine. *J Biol Chem*, 2002; 277:29753-29759.
- Venkova-Hristova K, Christov A, Kamaluddin Z, Kobalka P, Hensley K. Progress in therapy development for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res Int*, 2012, ID 187234, 9, doi:10.1155/2012/187234.
- Verkhatsky A, Olabarria M, Noristani HN, Yeh CY, Rodriguez JJ. Astrocytes in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*, 2010; 7:399-412.
- Vernin G, Metzger J. Analysis of Sage oils by CG-MS data bank- *Salvia officinalis* L. and *Salvia lavandulaefolia* Vahl. *Perfumer & Flavorist*, 1986; 11:79-84.
- Vilela GR, Almeida GS, D'Arce MA, Moraes MH, Brito JO, Silva MF, Silva SC, Piedade SM, Calori-Domingues MA, Gloria EM. Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. *J Stored Prod Res*, 2009; 45:108-111.
- Wake G, Court J, Pickering A, Lewis R, Wilkins R, Perry E. CNS acetylcholine receptor activity in European medicinal plants traditionally used to improve failing memory. *J Ethnopharmacol*, 2000; 69:105-114.
- Walker JB, Sytsma KJ, Treutlein J, Wink M. *Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematic, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and Tribe *mentheae*. *Amer J Bot*, 2004; 91:1115-1125.
- Wang CY, Wang SY, Chen C. Increasing antioxidant activity and reducing decay of blueberries by essential oils. *J Agric Food Chem*, 2008; 56:3587-3592.
- Wang CY, Wang SY, Yin J, Parry J and Yu LL. Enhancing antioxidant, antiproliferation, and free radical scavenging activities in strawberries with essential oils. *J Agric Food Chem*, 2007; 55:6527-6532.
- Wang G, Tang W, Bidigare RR. Terpenoids as therapeutic drugs and pharmaceutical agents. Natural Products: Drug discovery and therapeutic medicine. Edited Zhang L and Demain AL. *Humana Press*, 2005; 9:197-227.
- Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Rad Biol Med*, 1999; 27:612-616.
- Wang JY, Wen LL, Huang YN, Chen YT, Ku MC. Dual effects of antioxidants in neurodegeneration: direct neuroprotection against oxidative stress and indirect protection via suppression of glia-mediated inflammation. *Curr Pharm Des*, 2006; 12:3521-3533.
- Wang X, Wang Y, Kim HP, Nakahira K, Ryter SW, Choi AM. Carbon Monoxide Protects against Hyperoxia-induced Endothelial Cell Apoptosis by Inhibiting Reactive Oxygen Species Formation. *J Biol Chem*, 2007; 282:1718-1726.
- Wang ZB, Liu YQ, Cui YF. Pathways to caspase activation. *Cell Biol Int*, 2005; 29:489-496.
- Wei A, Shibamoto T. Antioxidant activities and volatile constituents of essential oils. *J Agric Food Chem*, 2007; 54:1737-1742.
- Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2004; 44:275-295.

- World Health Organization (WHO). 2009. <http://apps.who.int/gho/data/view.main.710>
- Wu F, Du L, Xu J, Tang Q, Xue C, Wang Y. Protective effects of cerebroside from sea cucumber on the oxidative damage of PC12 cells induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Wei Sheng Yan Jiu*, 2012; 41:612-6.
- Yan MH, Wang X, Zhu X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radic Biol Med*, 2012. pii: S0891-5849(12)01823-0. doi: 10.1016/j.freeradbiomed. 2012.11.014.
- Yoo CB, Han KT, Cho KS, Ha J, Park HJ, Nam JH, Kil UH, Lee KT. Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Cancer letters*, 2005; 225:41-52.
- Young AJ, Lowe GM. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch Biochem Biophys*, 2001; 385:20-27.
- Zadák Z, Hyspler R, Tichá A, Hronek M, Fikrová P, Rathouská J, Hrnčiariková D, Stetina R. Antioxidants and vitamins in clinical conditions. *Physiol Res*, 2009; 58:13-17.
- Zarzuelo A, Gamez JM, Utrilla P, Jimenez J, Jimenez I. Luteolin 5-rutinoside from *Salvia lavandulifolia* ssp. *oxyodon*. *Phytochemistry*, 1995; 40:1321-1322.
- Zarzuelo A, Risco S, Gámez MJ, Jimenez J, Cámara M, Martínez MA. Hypoglycemic action of *Salvia lavandulifolia* Vahl. ssp. *oxydon*: a contribution to studies on the mechanism of action. *Life Sci*, 1991; 47:909-915.
- Zelko I, Mariani T, Folz R. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*, 2002; 33:337-49.
- Zhang L, Yu H, Sun Y, Lin X, Chen B, Tan C, Cao G, Wang Z. Protective effects of salidroside on hydrogen peroxide-induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Eur J Pharmacol*, 2007; 564:18-25.
- Zhang PT, Chen ZR. Effect of *Salvia miltiorrhiza* on lipid peroxidation antioxidant enzymes activity in patients with chronic cor pulmonale. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 1994; 14:474-477.
- Zheljazkov V, Pickett KM, Caldwell CD, Pincock JA, Roberts JC, Mapplebeck L. Cultivar and sowing date effects on seed yield and oil composition of coriander in Atlantic Canada. *Ind Crop Prod*, 2008; 28:88-94.
- Ziemssen T, Reichmann H. Non-motor dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 2007; 13:323-332.
- Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther*, 2001; 92:57-70.
- Zrira S, Menut C, Bessiere JM, Elamrani A, Benjilali B. A study of the essential oil of *Salvia lavandulifolia* Vahl from Morocco. *J Essent Oil Bear Pl*, 2004; 7:232-238.
- Zupkó I, Hohmann J, Rédei D, Falkay G, Janicsák G, Máthé I. Antioxidant activity of leaves of *Salvia* species in enzyme-dependent and enzyme-independent systems of lipid peroxidation and their phenolic constituents. *Planta Med*, 2001; 67:366-368.